Aus der Abteilung für Zytopathologie
(Leiter: Prof. Dr. Dr. P. Pfitzer)
des Pathologischen Institutes der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. W. Hort)

Morphologische Verlaufsbeobachtungen an freien und fixen Zellen des Peritoneums der weissen NMRI - Maus nach intraperitonealer Applikation von Coronavirus-, Eiweiss- oder Kochsalzlösung sowie steriler Luft

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Peter Georg Cremerius

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Abteilung für Zytopathologie
(Leiter: Prof. Dr. Dr. P. Pfitzer)
des Pathologischen Institutes der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. W. Hort)

Morphologische Verlaufsbeobachtungen an freien und fixen Zellen des Peritoneums der weissen NMRI - Maus nach intraperitonealer Applikation von Coronavirus-, Eiweiss- oder Kochsalzlösung sowie steriler Luft

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Peter Georg Cremerius

1984

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. Dr. Pfitzer

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Fischer

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	2
2.1.	Versuchstiere	2
2.2.	Versuchsdurchführung	2
2.3.	Präparation und Färbung freier Peritonealzellen	3
2.4.	Peroxidase - Reaktion	5
2.5.	Herstellung von Häutchenpräparaten des Peritoneum parietale	6
2.6.	Blutausstriche	7
2.7.	Differenzierung der freien Peritonealzellen	7
3.	ERGEBNISSE	10
3.1.	Freie Peritonealzellen unbehandelter Kontrolltiere	10
3.2.	Freie Peritonealzellen der behandelten NMRI - Mäuse	16
3.2.1.	Neutrophile Granulozyten	16
3.2.2.	Eosinophile Granulozyten	17
3.2.3.	Basophile Peritonealzellen	17
3.2.4.	Lymphozyten	23
3.2.5.	Monozytäre Makrophagen Typ A	23
3.2.6.	Monozytäre Makrophagen Typ B	26
3.2.7.	Monozytäre Makrophagen Typ C	30
3.2.8.	Mitosen	30
3.2.9.	Grenzfälle der morphologischen Klassifizierung	31

3.3.	Peroxidase - Reaktion	43
3.4.	Fixe Zellen des Peritoneum parietale	50
4.	DISKUSSION	64
5.	ZUSAMMENFASSUNG	76
6.	LITERATURVERZEICHNIS	78

1. Einleitung

Untersuchungen zur Morphologie der freien und fixen Zellen der Bauchhöhle bei Entzündungen sind bereits im vorigen Jahrhundert durchgeführt worden (MARCHAND, 1899). In neueren Arbeiten wurde vorwiegend die Reaktion der Zellelemente des Peritoneums auf unterschiedliche nicht belebte Agentien geprüft (MOHR et al., 1971c, 1972a, 1972b; PARWARESCH et al., 1971) und quantitative Untersuchungen bei bakterieller Peritonitis vorgenommen (STEER u. LEWIS, 1983). Trotz dieser umfangreichen Untersuchungen ist die Herkunft der freien Peritonealzellen und ihre Beziehung zu den Deckzellen noch nicht völlig geklärt (DOMAGALA u. KOSS, 1979). Weitgehend unbekannt ist auch die Reaktion des Peritoneums und der freien Zellen der Bauchhöhle nach viraler Infektion.

Ziel unserer Versuche ist die systematische morphologische Verlaufsbeobachtung der freien und fixen Zellen des Peritoneums nach experimenteller Virusinfektion. Weiterhin soll geklärt werden, inwieweit allein die injektionsbedingte Instillation eines Flüssigkeitsvolumens oder Applikation von Luft Reaktionen im Cavum peritonei hervorrufen.

In der Bauchhöhle finden sich lichtmikroskopisch schon unter physiologischen Verhältnissen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Letztere können aufgrund ihrer Kernmorphologie in drei Typen unterteilt werden. Anhand morphologischer Verlaufsbeobachtungen und zytochemischer Untersuchungen soll geklärt werden, ob es sich bei diesen Makrophagentypen um verschiedene Differenzierungsstufen einer Zellinie oder um Zellen unterschiedlicher Herkunft handelt.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Versuche werden an 516 weißen männlichen NMRI - Mäusen (Tierversuchsanlage Hanover) durchgeführt. Das Durchschnittsgewicht der Tiere liegt bei 14,5 g. Das Alter der Mäuse beträgt bei Versuchsbeginn 3 Wochen. Entsprechend den Empfehlungen von MAYR et al. (1974) werden die Mäuse in Stellagen gehalten, die jedem Tier ca. 60 cm^2 Platz bieten. Die Raumtemperatur liegt zwischen 20 und 24 Grad Celsius, die Luftfeuchtigkeit bei ca. 50%. Gefüttert wird mit Altromin-Standard-Diät^R; Wasser ad libitum.

2.2. Versuchsdurchführung

Die Tiere werden in 5 Gruppen aufgeteilt: 2 Gruppen (V und S) zu je 156 Tieren und 2 Gruppen (N und L) zu je 96 Tieren. Die 5. Gruppe (O), die unbehandelt bleibt, umfaßt 12 Tiere. Intraperitoneal (i.p.) injiziert werden:

Gruppe V: 0.5 ml einer Coronaviruslösung vom Stamm 229 E in einer Konzentration von 10^6 ID_{50}/ml. Nährmedium: F 11 und 2%iges fetales Kälberserum. Die Behandlung und Haltung dieser Gruppe erfolgt in einem gesonderten Raum.

Gruppe S: 0.5 ml des oben genannten Nährmediums.

Gruppe N: 0.5 ml isotonische Natriumchloridlösung.

Gruppe L: 1.0 ml sterile Luft. Die Sterilfilterung der Luft erfolgt mit einem Millex-FG^R Filteraufsatz der Firma Millipore GmbH (Porenweite: 0.2 µm). Um eine deutliche Reaktion zu erreichen, applizieren wir hier die doppelte Volumenmenge.

Alle Injektionen werden in Ätherkurznarkose bei angehobener Bauchfalte durchgeführt, um sicher und ohne Organverletzung intrakavitär zu instillieren. Injektionsnadeln Nr. 18 (0.45 x 23 mm). Bei der Applikation der Flüssigkeiten wird durch eine spezielle Einstichtechnik streng auf luftfreie Injektion geachtet (MAYR et al., 1974).

Für unsere Untersuchungen wählen wir folgende Zeitabstände (s. Tab. 1).

Die Anzahl der Versuchstiere beträgt pro Gruppe und Zeitpunkt 12 Mäuse. Für die Untersuchungen an den fixen Peritonealzellen werden ab dem 3. Tag post injectionem (p.i.) aus jeder Gruppe 2-3 Tiere ausgewählt. Die unbehandelten Kontrolltiere (=Gruppe O) werden am 2. Tag p.i. untersucht.

2.3. Präparation und Färbung freier Peritonealzellen

Die Tiere werden durch Überdosierung einer Äthernarkose getötet. Eine mit der Pinzette gefaßte Hautfalte wird inzidiert, sodann das Fell vorsichtig zirkulär auseinandergezogen und nach kranial sowie kaudal abpräpariert. Danach Anheben der Bauchdecke und Einstich mit einer ler Kanüle an einer gefäßfreien Stelle. Dann Instillation von 4 ml physiologischer Ringerlösung unter mäßigem Druck. Durch die dabei entstehenden Turbulenzen sollen freie Peritonealzellen aufgewirbelt und gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt werden. Eventuell zusätzlich vorsichtiges Hin- und Herbewegen des Versuchstieres. Anschließend wird die Maus mit einer Pinzette an der Bauchfalte hochgehalten, und diese unterhalb der Faßstelle etwas eingeschnitten. So wird vermieden, daß die Spülflüssigkeit nach der Inzision gleich wieder herausläuft. Dann wird die Flüssigkeit sofort mit einer Spritze ohne Nadel wieder abgesaugt. Nach diesem Verfahren gelingt in der Regel eine blutfreie und zellreiche Peritoneallavage. Bis zur weiteren Verarbeitung

Gruppe	6h	12h	18h	24h	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d p.i.
V	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
S	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
N	x	x	x	x	x	x	x	x					
L	x	x	x	x	x	x	x	x					

Tab. 1:

Versuchszeitplan.

x = Untersuchungen an freien Peritonealzellen

- = Untersuchungen an fixen Peritonealzellen

werden die Spritzen mit der Spülflüssigkeit abgedichtet im Kühlschrank aufbewahrt.
In die Zytozentrifuge (Cytospin, Shandon-Elliot) werden pro Präparat 2 bis 4 Tropfen der Lavageflüssigkeit gegeben, nachdem vorher die Zellen in der Spritze nochmals kurz aufgeschüttelt wurden. Anschließend wird bei 700-800 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert. Luftgetrocknete Präparate werden mit May-Grünwald-Giemsa (MGG) gefärbt und mit Entellan^{R} eingedeckt. Für die Papanicolaoufärbung werden die Präparate nach Zentrifugation sofort mit Merckofix^{R}-Spray fixiert.

2.4. Peroxidase - Reaktion

Die Peroxidase - Reaktion (Pox) wird in einer Modifikation der Methode nach SCHÄFER und FISCHER (1968) durchgeführt:

- Fixieren in Äthanol/Formalin[1] : 30 sec
- Wässern und lufttrocknen
- Reaktion mit Inkubationsmedium[2] : 30 min
- 5 min wässern
- Färbung mit Hämalaun : 5 min
- Wässern und eindecken mit Gelantine.

1) Fixierlösung: Äthanol (100%) + Formalin (4%) = 9+1

2) Inkubationsmedium:

10 mg 9-Äthyl-3-Amino-Carbazol in
6 ml Dimethylsulfoxid lösen.
+ 29 ml Stammlösung[3] Veronalnatriumpuffer
+ 21 ml 0.1 N HCl (ph = 7.4)
+ 0.5 ml H_2O_2 0.3%ig
ad 100 ml Aqua dest. auffüllen.

UNIV. LEIDEN BIBL.

3) Stammlösung:

20,618 g 5,5-Diäthylbarbitalnatrium
ad 1000 ml Aqua dest. (= 0.1 M Lsg.)

2.5. Herstellung von Häutchenpräparaten des Peritoneum parietale

Von 2-3 Tieren je Gruppe fertigen wir Häutchenpräparate an. Ihre Herstellung erfolgt nach der von FEIGEL (1970) und BENEKE et al. (1970) angegebenen Methode, die wie folgt von uns modifiziert worden ist:

Zuerst wird die gesamte Bauchdecke des Tieres exzidiert, mit der Außenseite auf eine Korkscheibe gelegt und ohne Spannung mit Nadeln fixiert. Dann das Präparat kurz in einer 0.3 %igen Silbernitratlösung abspülen, um freie Zellen und die Chloridionen der Ringerlösung zu entfernen. Danach Anfärben der Zellgrenzen in einem zweiten Bad der 0.3 %igen Silbernitratlösung für 30 Sekunden. Anschließend 30 bis 60 Minuten in absolutem Alkohol schwimmend fixieren. Danach werden die Präparate eine Minute lang in Äther getaucht und anschließend ca. eine Stunde gut luftgetrocknet. Durch diese Behandlung kommt es auf der Bauchdeckeninnenseite stellenweise zu einem sichtbaren Abheben eines weißen Häutchens, das einer teilweisen Lösung des einschichtigen Mesothels vom darunterliegenden Bindegewebe entspricht.

Im Brutschrank angewärmtes Hydratzelluloseband (= Tesafilm Nr. 101, Beiersdorf, Hamburg) sanft auf die Mesotheloberseite aufkleben und dann vorsichtig mit dem Tesaband die einschichtige Mesothelzellage abziehen. Restliches anhängendes Bindegewebe mit der Pinzette oder Skalpell abpräparieren. Den Tesastreifen mit der Mesothelschicht auf einen mit Eiweißglyzerin vorbehandelten Objektträger aufkleben und fest anpressen. Mehrere Präparate aufeinanderstapeln und mit Klemmen unter Druck

setzen. Vier Tage im Trockenschrank bei 37^0 C trocknen lassen; die Klemmen dabei täglich nachziehen. Nach dieser Zeit die Präparate für 30 Sekunden in kaltes Wasser tauchen, dann überschüssiges Wasser mit Zellstoff schnell wieder absaugen und Klebefolie entfernen. Die Präparate anschließend nochmals im Trockenschrank bei max. 37^0 C trocknen lassen. Hierbei ist unbedingt darauf zu achten, daß die Klebemasse keine Blasen bildet. Nach dem Trocknen werden die Objektträger senkrecht für 30 Minuten in ein erstes Xylolbad gestellt. Vorsichtiges Abziehen der restlichen sich lösenden Klebemasse mit einer Pinzette. Anschließend für weitere 15 Minuten in ein zweites Xylolbad. Vorgang bei Bedarf wiederholen bis sich keine Klebemasse mehr auf dem Objektträger befindet. Ein weiteres kurzes drittes Xylolbad anschließen und sodann sofort mit MGG färben. Vor dem Eindecken nicht festhaftende Zellverbände mit dem Skalpell entfernen.

2.6. Blutausstriche

Von einigen Tieren wird aus der Vena cava inf. Blut entnommen und ausgestrichen. Die Präparate werden ebenfalls mit MGG gefärbt und der Peroxidase - Reaktion unterworfen.

2.7. Differenzierung der freien Peritonealzellen

Die mit MGG gefärbten Zytozentrifugenpräparate werden nach folgenden Zelltypen differenziert und ausgezählt:

- Mononukleäre Zellen
- Neutrophile Granulozyten
- Eosinophile Granulozyten
- Basophile freie Peritonealzellen

Die Gruppe der "Mononukleären Zellen" wird separat in folgende Zellklassen weiter unterteilt:

- Lymphozyten
- Monozytäre Makrophagen mit rundem bis ovalem Kern (= Typ A)
- Monozytäre Makrophagen mit ausgeprägt gelappten, bzw. ringförmigen Kernen (= Typ C)
- Monozytäre Makrophagen mit sog. "Übergangskernen", d.h. Zellkernformen, die sich zwischen den beiden oben genannten Formen einordnen lassen (= Typ B)
- Mitosefiguren, einschl. mehrkerniger Zellen

(Abb. 1)

Es werden pro Präparat ca. 350 bis 400 Zellen ausgewertet. Die Absolutzahlen werden in Prozentzahlen umgerechnet, das arithmetische Mittel gebildet sowie die Standardabweichung $\pm$ s errechnet.

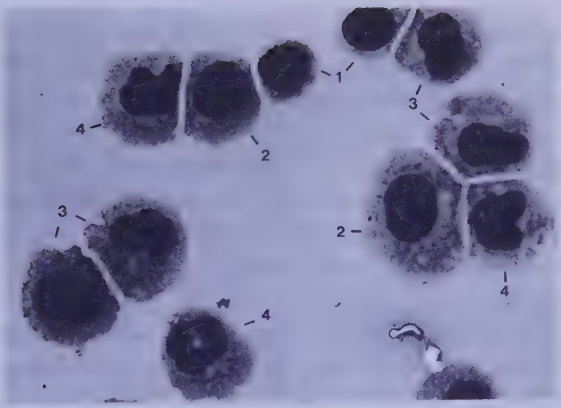


Abb. 1 :

Freie Peritonealzellen der unbehandelten weißen NMRI - Maus (männl., 3 Wochen).

1 = Lymphozyten
2 = Monozytäre Makrophagen Typ A
3 = Monozytäre Makrophagen Typ B
4 = Monozytäre Makrophagen Typ C

MGG x950

3. Ergebnisse

Die Tiere aller Gruppen erholten sich rasch nach der intraperitonealen Injektion in Äthernarkose und zeigen während der ganzen Versuchsdauer keinerlei klinische Auffälligkeiten.
Bei den Tieren, denen eine Virus-, Eiweiß- bzw. Kochsalzlösung i.p. injiziert worden ist, lassen sich schon 6 Stunden p.i. keine Flüssigkeitsreste in der Bauchhöhle mehr feststellen.
Bei den Tieren, denen Luft appliziert worden ist, sind bis zu 24 Stunden p.i. noch Luftbläschen in der Bauchhöhle makroskopisch erkennbar (s. Tab. 2).
Eine Aszitesbildung ist zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Dabei ist davon auszugehen, daß erfahrungsgemäß Flüssigkeitsmengen erst ab 0.5 bis 1.0 ml als Aszitesbildung erkannt werden können. Die eröffneten Bauchhöhlen erscheinen bei allen Tieren makroskopisch unauffällig. Bauchfell und innere Organe zeigen keine Anzeichen einer entzündlichen Veränderung.

3.1. Freie Peritonealzellen unbehandelter Kontrolltiere

Bei 461 Tieren (= 89.3%) gelingt es, durch Peritoneallavage eine ausreichende Menge an Zellmaterial zu gewinnen. Bei den restlichen Tieren ist die Ausbeute entweder zu gering oder es kommt zum Zellhydrops bzw. zur Zytolyse, so daß eine Auswertung nicht möglich ist.
In der panoptischen Färbung nach Pappenheim ist eine Differenzierung der freien Peritonealzellen in die einzelnen Zelltypen leicht möglich. Insbesondere können auch die lymphozytären von den monozytären Zellen unterschieden werden.
Die Lymphozyten stellen sich in typischer Weise dar: ihr Zellkern mit seiner dichten scholligen rotvioletten Chromatinstruktur ist fast ausnahmslos rund geformt. Er ist von einem klarblauen, homogenen, rundlichen Zytoplasmasaum mit einer geringen perinukleären Aufhellung umgeben. Bei den größeren Lympho-

Zeit p.i.	Luftbläschen sichtbar bei
6 h	12 Tieren
12 h	12 Tieren
18 h	8 Tieren
24 h	9 Tieren
48 h	0 Tieren

Tab. 2:

Intraperitoneale Luftretention in Versuchsgruppe L.

zyten ist die Kernplasmarelation zu Gunsten des Zytoplasmas verschoben.
Die Kerne der monozytären Zellen zeigen ein grobretikuläres Chromatingerüst. Die blaßrotviolett gefärbte Kernstruktur wirkt lockerer als die der Lymphozyten. Charakteristisch ist auch das breitere taubenblaugraue Zytoplasma, das meist unregelmäßig begrenzt, weniger homogen und häufiger vakuolisiert ist. Auffallend ist die Polymorphie der Kerne, so daß eine Einteilung der monozytären Makrophagen in drei Typen möglich ist (Abb. 1).
Die beobachteten mitotischen Figuren zeigen alle Stadien der Kern- und Zellteilung (Abb. 2, 3, 4).
Die Kerne der Granulozyten sind stark segmentiert und stellen sich häufig ringförmig oder auch in Achterform dar. Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten aus der Peritonealhöhle färbt sich schwächer an als das der Blutneutrophilen (Abb. 5, 14b). Die Granulation der eosinophilen Granulozyten ist im Gegensatz zu der bei menschlichen Eosinophilen sehr fein (Abb. 14b).

Das Zellspektrum der freien Peritonealzellen der unbehandelten weißen NMRI - Maus weist folgende Verteilung auf:

	%	SD ±
- Mononukleäre Zellen	96.9	0.1
- Basophile Peritonealzellen	1.9	1.0
- Neutrophile Granulozyten	0.1	0.1
- Eosinophile Granulozyten	1.1	0.6

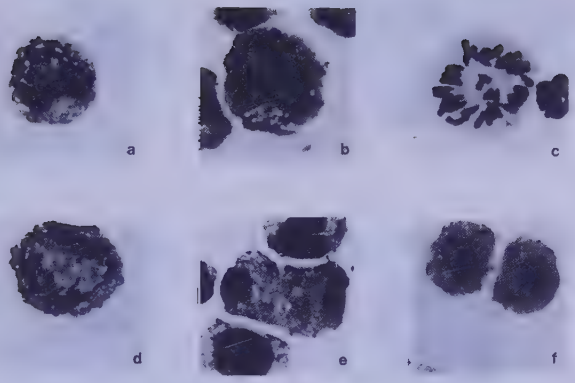
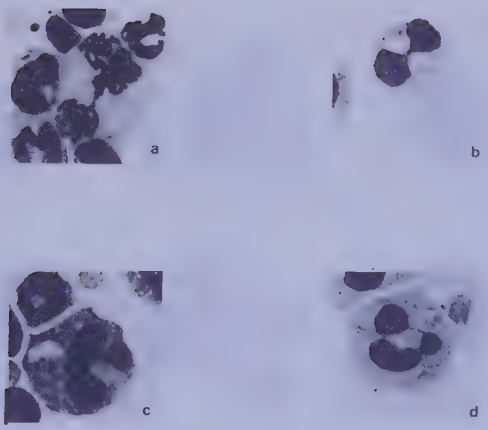


Abb. 2 a - g :

Kernteilungsfiguren monozytärer Peritonealmakrophagen.

a = Prophase
b = Frühe Metaphase
c = Metaphase
d = Anaphase
e = Telophase
f = Telophase mit Zytokinese
g = Zweikernige Peritonealzelle

MGG x950



Späte Anaphase mit chromosomaler Brückenbildung.

MGG x950

Abb. 3 b :

Bildung internukleärer Chromatinbrücke als Folge unvollständiger Kernteilung.

MGG x950

Abb. 3 c, d :

Segmentierung ungleich großer Kernteile.

MGG x950

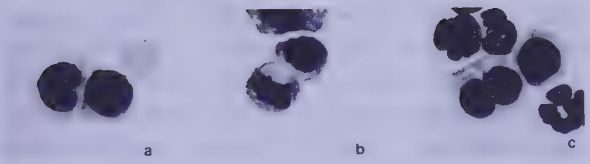


Abb. 4 a :

Überzufällig häufig beobachtet man das paarweise Auftreten von Lymphozyten.

MGG x950

Abb. 4 b, c :

Mitotische Figuren lymphatischer Zellen.

MGG x950

Abb. 5 a - c :

Neutrophile Granulozyten im Blutausstrich (a) zeigen ein stärker angefärbtes Zytoplasma als solche in der Bauchhöhle (b, c).
Drumstickartige Anhängsel bei Granulozyten männlicher NMRI - Mäuse.

MGG x950

Dabei verteilen sich die Mononukleären Zellen wie folgt:

	%	SD ±
- Lymphozyten	13.7	4.9
- Makrophagen Typ A	6.6	4.9
- Makrophagen Typ B	23.8	7.3
- Makrophagen Typ C	52.8	8.4
- Mitosefiguren	3.1	0.9

3.2. Freie Peritonealzellen der behandelten NMRI - Mäuse

3.2.1. Neutrophile Granulozyten

6 Stunden nach intraperitonealer Injektion erfolgt in der Gruppe V ein maximaler Anstieg neutrophiler Granulozyten von 0.1 % auf 59.8 ±10.0 %. Es vollzieht sich jedoch sogleich wieder ein rascher Abfall, so daß nach 48 Stunden der prozentuale Anteil nur noch 11.4 % beträgt und ab dem 5. Tag unter 3 % liegt (Abb. 6a).

Das Verhalten der neutrophilen Granulozyten der Gruppe L ist nahezu identisch mit der Gruppe V (Abb. 6b).

Der Anstieg der Neutrophilen in der Gruppe S innerhalb der ersten 6 Stunden liegt mit 41.7 ±15.6 % deutlich niedriger als in den Gruppen V und L. Auch nach 48 Stunden p.i. ist der Durchschnittswert mit 42.6 ±10.0 % fast unverändert. Danach erfolgt ein rascher Abfall, so daß ab 3. Tag p.i. der prozentuale Anteil wieder unter 3 % liegt (Abb. 6c).

Nur 74 % der Versuchstiere, denen Kochsalz injiziert wurde (= Gruppe N), zeigen in den ersten 24 Stunden eine deutliche neutrophile Reaktion. Die restlichen 26 % zeigen weniger als 3 % Neutrophile. Dies wird nicht als Reaktion bewertet, da die

95%-Vertrauensgrenze bei einem statistisch ermittelten Normalwert von 0.1 % der Neutrophilen zwischen 0 und 3 % liegt. Da man davon ausgehen kann, daß bei einem Teil der Tiere eine intraperitoneale entzündliche Reaktion nicht stattgefunden hat, wird ein Kurvensplitting unter den Versuchstieren mit einer starken neutrophilen Reaktion (= Kurve A) und denen ohne neutrophile Reaktion (= Kurve B) durchgeführt (Abb. 6d).

3.2.2. Eosinophile Granulozyten

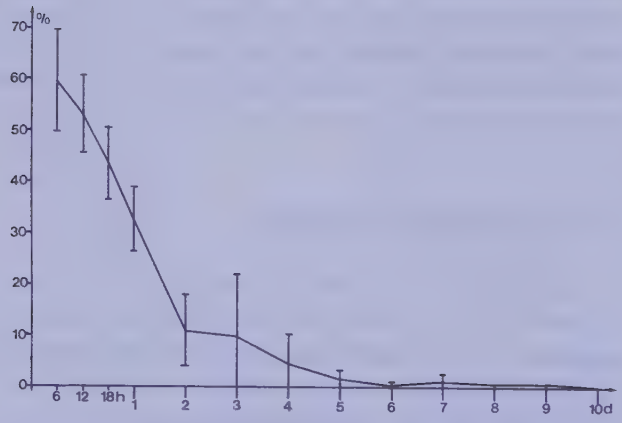
In den Gruppen V und N kommt es lediglich in den ersten 24 bzw. 48 Stunden p.i. zu einem leichten Anstieg der eosinophilen Granulozyten, die sich ansonsten mit einer etwas größeren Standardabweichung im Normbereich bewegen (Abb. 7a,b).
Die mit Kälberserum behandelte Gruppe S zeigt im Verlauf der zehn Versuchstage eine angedeutete Periodik. Die realtiv großen Standardabweichungen weisen auf große interindividuelle Unterschiede hin (Abb. 7c).
Ein signifikanter Anstieg der eosinophilen Granulozyten zeigt sich in der mit Luft behandelten Gruppe L. Schon 12 Stunden p.i. ist mit 8.5 ±4.5 % der Normwert deutlich überschritten. Am 3. Tag p.i. wird ein maximaler Eosinophilenanstieg von 31.0 ±6.0 % verzeichnet. Noch nach 5 Tagen liegt der prozentuale Anteil bei 17.8 ±7.4 % (Abb. 7d).

3.2.3. Basophile Peritonealzellen

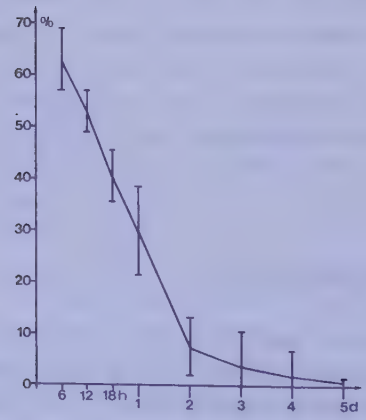
Die Verlaufsbeobachtung der basophilen Peritonealzellen zeigt bis auf ein mäßiges prozentuales Abfallen in den ersten 24 Stunden bei keiner der vier Gruppen Auffälligkeiten (Abb. 8a-d).

Abb. 6 :

NEUTROPHILE GRANULOZYTEN

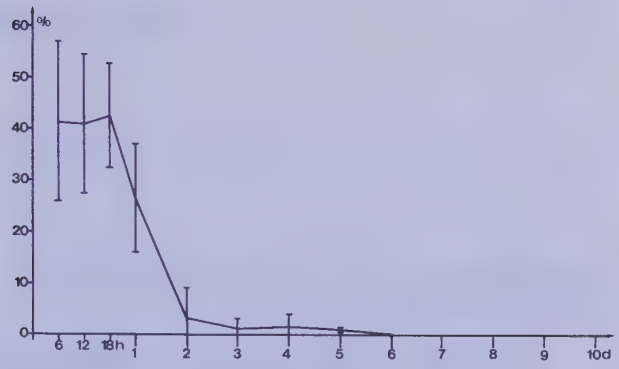


a: 0.5 ml Coronaviruslösung i.p.

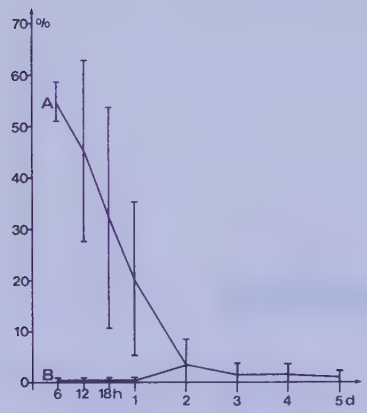


b: 1.0 ml sterile Luft i.p.

Abb. 6 :



c: 0.5 ml 2%iges Kälberserum i.p.



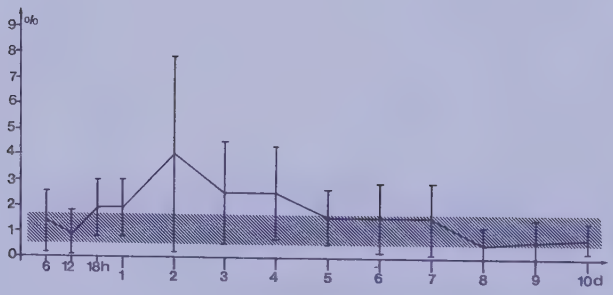
d: 0.5 ml physiologische Kochsalzlösung i.p.

A = Tiere mit mehr als 3 % neutrophilen Granulozyten

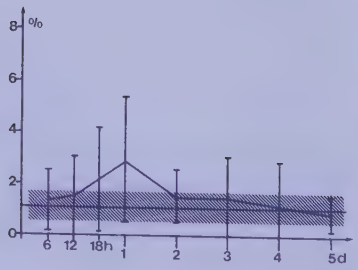
B = Tiere mit weniger als 3 % neutrophilen Granulozyten

Abb. 7 :

EOSINOPHILE GRANULOZYTEN

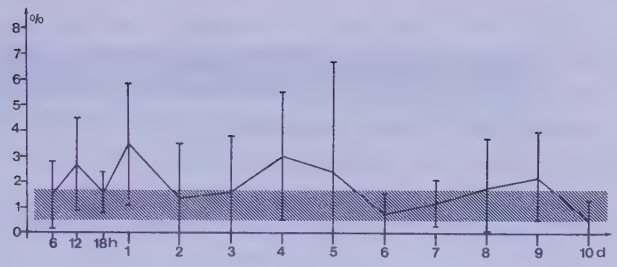


a: o.5 ml Coronaviruslösung i.p.

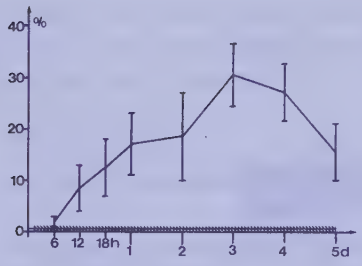


b: o.5 ml physiologische Kochsalzlösung i.p.

Abb. 7 :



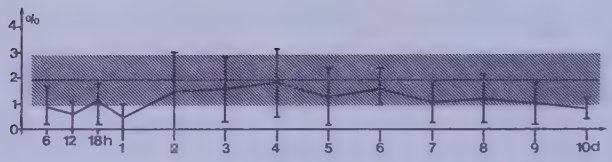
c: 0.5 ml 2%iges Kälberserum i.p.



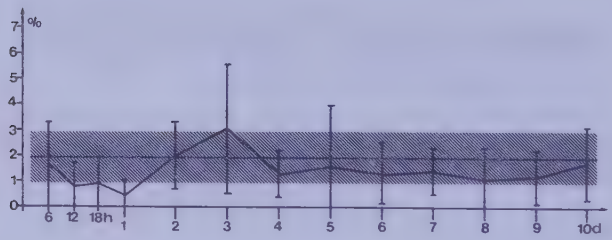
d: 1.0 ml sterile Luft i.p.

Abb. 8 :

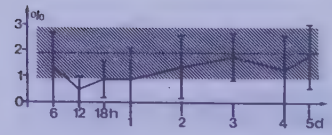
BASOPHILE PERITONEALZELLEN



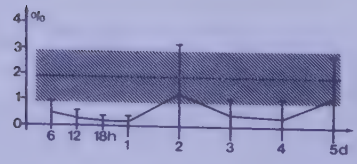
a: 0.5 ml Coronaviruslösung i.p.



b: 0.5 ml 2%iges Kälberserum i.p.



c: 0.5 ml physiologische Kochsalzlösung i.p.



d: 1.0 ml sterile Luft i.p.

3.2.4. Lymphozyten

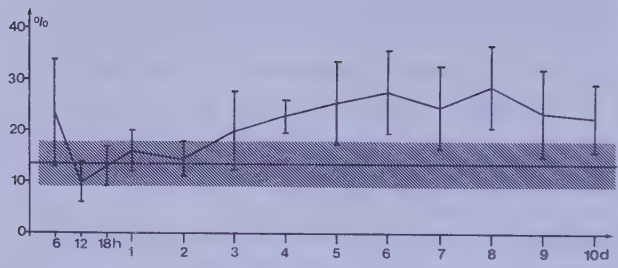
6 Stunden p.i. ist in der Gruppe V ein Lymphozytenanstieg zu verzeichnen, der sich mit einem Mittelwert von 23.6 ±10.5 % deutlich aus dem Normbereich hinausbewegt. Nach weiteren 6 Stunden erreichen die Lymphozytenwerte wieder die Ausgangsposition, um dann ab dem 3. Tag wieder deutlich anzusteigen. Am 8. Tag p.i. wird ein Durchschnittsmaximalwert von 28.8 ± 7.6 % erreicht. Danach fallen die Werte langsam wieder ab (Abb. 9a).
Die Gruppe L zeigt bis zum 5. Tag einen der Gruppe V fast parallelen Kurvenverlauf (Abb. 9b).
Die Durchschnittswerte der Lymphozyten in der Gruppe S liegen tageweise deutlich über dem Normbereich. Ansonsten sind in dieser Gruppe keine Veränderungen zu beobachten (Abb. 9c).
In der Gruppe N zeigt sich zwar eine durchschnittliche Erhöhung der Lymphozytenwerte von Versuchstieren mit granulozytärer Reaktion (= Kurve A), die breiteren, sich überschneidenden Standardabweichungen beider Kurven zeigen aber, daß das Verhalten der Lymphozyten und der neutrophilen Granulozyten nicht miteinander korrelieren (Abb. 9d).

3.2.5. Monozytäre Makrophagen des Typs A

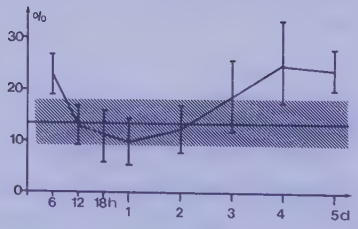
In den ersten 6 Stunden erfolgt in der Gruppe V ein Anstieg der Makrophagen des Typs A. Ab 18 Stunden p.i. befinden sich die Werte jedoch wieder im Normbereich und zeigen bis zum 6. Tag eine leicht fallende Tendenz (Abb. 10a).
In der Gruppe S liegen die Werte in den ersten 5 Tagen fast ausnahmslos im oberen Normbereich. In der zweiten Hälfte des Versuchszeitraums erreichen sie wieder die Ausgangswerte (Abb. 10b).
In der Gruppe N ist kein signifikantes Kurvenverhalten zu beobachten (Abb. 10c).

Abb. 9 :

LYMPHOZYTEN

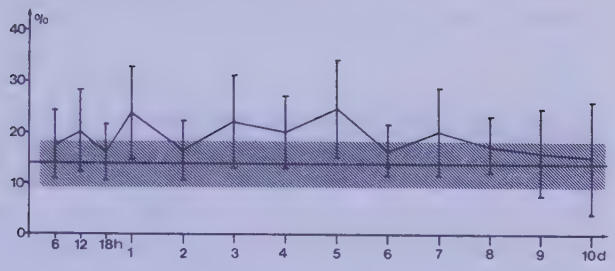


a: 0.5 ml Coronaviruslösung i.p.

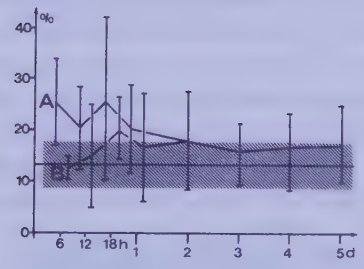


b: 1.0 ml sterile Luft i.p.

Abb. 9 :



c: o.5 ml 2%iges Kälberserum i.p.



d: 0.5 ml physiologische Kochsalzlösung i.p.

A = Tiere mit mehr als 3 % neutrophilen Granulozyten

B = Tiere mit weniger als 3 % neutrophilen Granulozyten

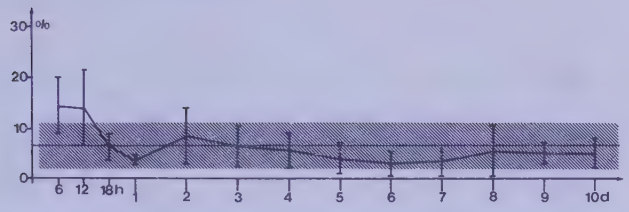
12 Stunden p.i. kommt es in der Gruppe L zu einem mäßigen Anstieg innerhalb des Normbereiches, um diesen am 3. Versuchstag zu verlassen. Am 4. Tag p.i. wird das Maximum mit 16.3 ±5.0 % erreicht (Abb. 10d).

3.2.6. Monozytäre Makrophagen des Typs B

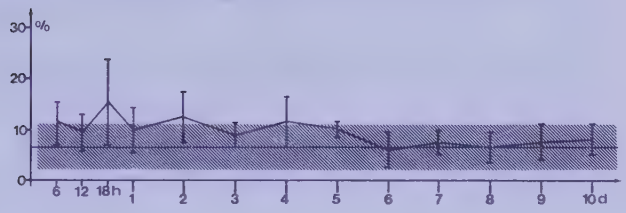
In der Gruppe V kommt es zu einem deutlichen Anstieg dieses Zelltyps mit einem Maximum bereits 6 Stunden p.i. mit 45.0 ±7.9 %. Danach vollzieht sich ein sehr deutlicher Abfall, sodaß 24 Stunden nach Versuchsbeginn Werte unterhalb des Normbereichs erreicht werden. Bis zum 10. Tag p.i. bleiben die Werte auf dieser Höhe und erreichen den Normbereich nicht (Abb. 11a).
Auch in der Gruppe S kommt es in den ersten 6 Stunden zu einem starken Anstieg dieses Zelltyps bis auf 46.0 ±7.3 %. Das Maximum wird 18 Stunden p.i. mit 47.5 ±7.4 % erreicht. Danach erfolgt ein Abfall in den oberen und nach 4 Tagen in den mittleren Normbereich. Gegen Ende des Versuchszeitraums steigen die Werte nochmals an (Abb. 11b).
In den ersten 6 Stunden erfolgt in der Gruppe L ein Anstieg der Makrophagen des Typs B bis auf 44.6 ±7.5 % und erreicht 12 Stunden p.i. ein Maximum von 52.0 ±4.7 %. Die Werte fallen jedoch dann langsamer ab als in Gruppe V und S und erreichen erst am 4. Tag p.i. den oberen Normbereich (Abb. 11c).
In der Gruppe N zeigt sich, daß es auch bei den Tieren mit neutrophiler Reaktion besonders in den ersten 18 Stunden p.i. mit 41.4 ±5.8 % zu ähnlich hohen Prozentwerten dieses Makrophagentyps kommt, die am 2. Tag p.i. in den Normbereich wieder eintreten (= Kurve A). Ohne neutrophile Reaktion ergibt sich kein signifikanter Anstieg dieser Makrophagen (= Kurve B) (Abb. 11d).

Abb. 10 :

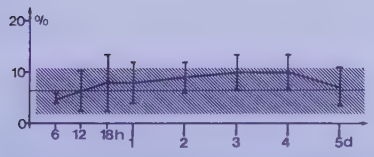
MONOZYTÄRE MAKROPHAGEN TYP A



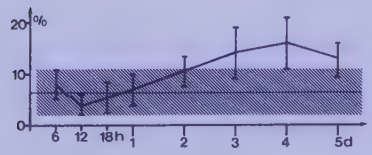
a: 0.5 ml Coronaviruslösung i.p.



b: 0.5 ml 2%iges Kälberserum i.p.



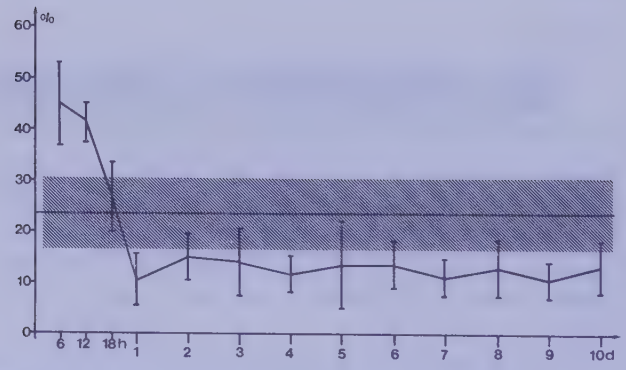
c: o.5 ml physiologische Kochsalzlösung i.p.



d: 1.0 ml sterile Luft i.p.

Abb. 11 :

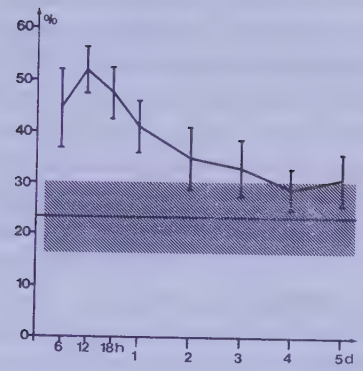
MONOZYTÄRE MAKROPHAGEN TYP B



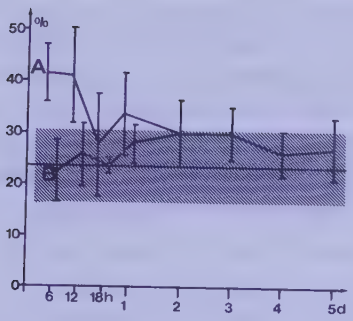
a: 0.5 ml Coronaviruslösung i.p.

b: 0.5 ml 2%iges Kälberserum i.p.

Abb. 11 :



c: 1.0 ml sterile Luft i.p.



d: 0.5 ml physiologische Kochsalzlöung i.p.

A = Tiere mit mehr als 3 % neutrophilen Granulozyten

B = Tiere mit weniger als 3 % neutrophilen Granulozyten

3.2.7. Monozytäre Makrophagen des Typs C

Innerhalb der ersten 6 Stunden kommt es in der Gruppe V zu einem starken prozentualen Abfall dieser Zellklasse. Es wird ein Minimalwert von 16.7 ±8.2 % erreicht. Es folgt dann wieder ein kontinuierlicher Anstieg mit Passieren des Normbereiches nach 18 Stunden und Erreichen eines Maximalwertes von 68.7 ±6.3 % nach 24 Stunden. Spätestens nach 3 Tagen ist der Normbereich jedoch wieder erreicht (Abb. 12a).
In der Gruppe S erfolgt ein etwas geringerer prozentualer Abfall des Makrophagentyps C, der erst 18 Stunden p.i. sein Minimum mit 20.2 ±6.7 % erreicht. Es folgt dann nur ein langsamer Wiederanstieg, der erst ab dem 6. Tag nach Versuchsbeginn in den unteren Normbereich gelangt (Abb. 12b).
Das Maximum des Abfalls wird in der Gruppe L bereits nach 6 Stunden mit 23.4 ±5.9 % erreicht. Ähnlich wie in Gruppe V kommt es dann wieder zu einem Anstieg mit Maximum am 1. Tag p.i., wobei dieser Wert mit 41.2 ±7.0 % jedoch noch unter dem Normbereich liegt. Es folgt ein zweiter prozentualer Abfall dieser Zellklasse, der am 4. Tag p.i. mit 25.8 ±7.8 % einen weiteren Tiefpunkt erreicht (Abb. 12c).
Das Splitting des Kurvenverlaufs in Gruppe N zeigt, daß bei den Tieren mit einer neutrophilen Reaktion es ebenfalls zu einem Abfall des Makrophagentyps C kommt (= Kurve A). Ähnlich wie in Gruppe S folgt dann wieder ein langsamer Anstieg. Bei fehlender Neutrophilenreaktion zeigt sich innerhalb der ersten 24 Stunden eine abfallende Tendenz im Normbereich. Der gemeinsame Kurvenendteil verläuft dann unterhalb des Normbereiches (Abb.12d).

3.2.8. Mitosen

Bei den mitotischen Figuren handelt es sich fast ausnahmslos um Zellen der monozytären Makrophagen. Selten werden Lymphozyten im Stadium der Kernteilung beobachtet. Überzufällig häufig

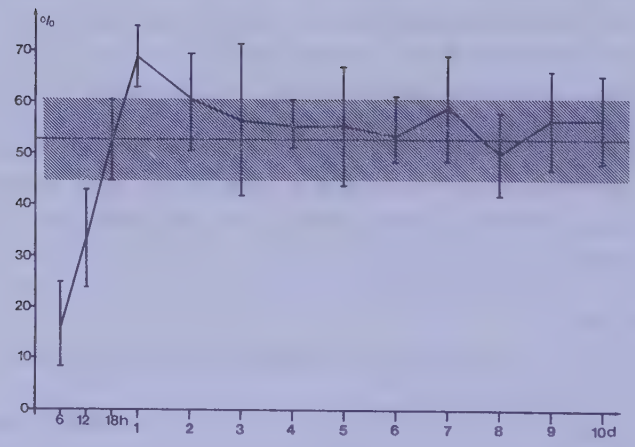
findet man dagegen Lymphozyten, die paarweise zusammenliegen (Abb. 2, 3, 4).
In der Verlaufsbeobachtung fällt eine Verminderung der Mitosen in den ersten 24 Stunden auf, die besonders in den Gruppen V und L ausgeprägt ist. Mit Ausnahme der Gruppe V kommt es bei allen Gruppen am 2. und 5. Tag p.i., bei der Gruppe S leicht angedeutet auch am 8. Tag p.i., zu einem prozentualen Anstieg der Mitosen. In der Gruppe V ist ein derartiges periodenhaftes Verhalten kaum zu erkennen. Bemerkenswert ist, daß der Kurvenverlauf der Gruppe L dem der Gruppen S und N zwar ähnelt, der Prozentsatz an mitotischen Figuren jedoch deutlich niedriger ist (Abb. 13a-d).

3.2.9. Grenzfälle der morphologischen Klassifizierung

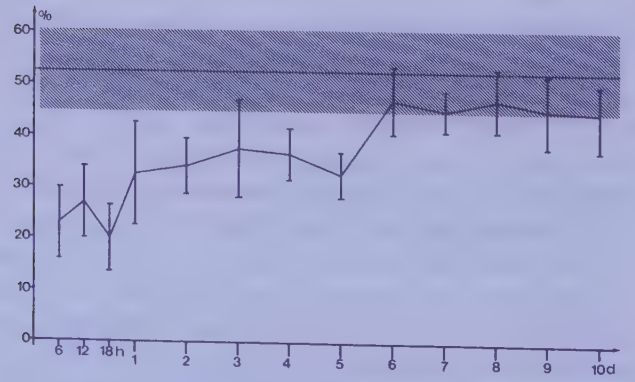
In den Zytozentrifugenpräparaten der vier Versuchsgruppen gelingt es in den meisten Fällen, die einzelnen Zellpopulationen den oben genannten Zelltypen eindeutig zuzuordnen. Schwierigkeiten bereitet jedoch das Auftreten einer Zellvariante, die sich morphologisch als eine Zwischenform der großen Lymphozyten und der monozytären Makrophagen des Typs B darstellt (Abb. 14). Einige dieser Zellen zeigen die eingebuchtete Kernform der Lymphozyten, so daß es sich hier offensichtlich um sogenannte lymphatische Reizformen handelt. Meistens fehlt jedoch das für Lymphozyten typisch blaue, runde Zytoplasma, das hier in Form und Farbe mehr dem der Makrophagen entspricht. Auch die Kerngröße sowie die unregelmäßige Kernform erinnern an diesen Zelltyp. Lediglich die dichtere scholligere Chromatinstruktur mit geringer grobretikulärer Zeichnung spricht für den lymphozytären Charakter dieser Zellen. Da es in den meisten Fällen nicht sicher möglich ist, diese Zellen eindeutig den Lymphozyten bzw. den monozytären Makrophagen zuzuordnen, oder sie als eigene Zellpopulation zubewerten, werden sie den Makrophagen des Typs B zugeordnet.

Abb. 12 :

MONOZYTÄRE MAKROPHAGEN TYP C

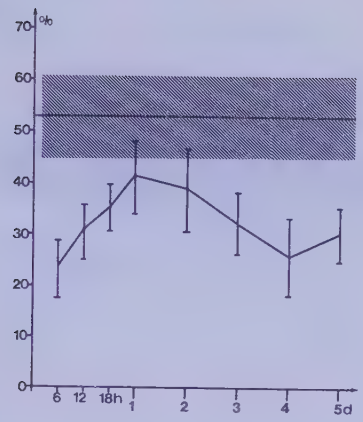


a: 0.5 ml Coronaviruslösung i.p.

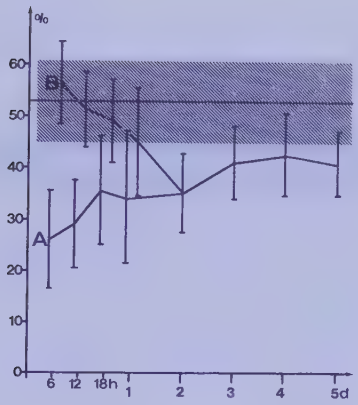


b: 0.5 ml 2%iges Kälberserum i.p.

Abb. 12 :



c: 1.0 ml sterile Luft i.p.



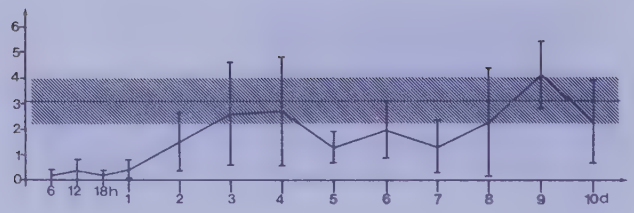
d: 0.5 ml physiologische Kochsalzlösung i.p.

A = Tiere mit mehr als 3 % neutrophilen Granulozyten

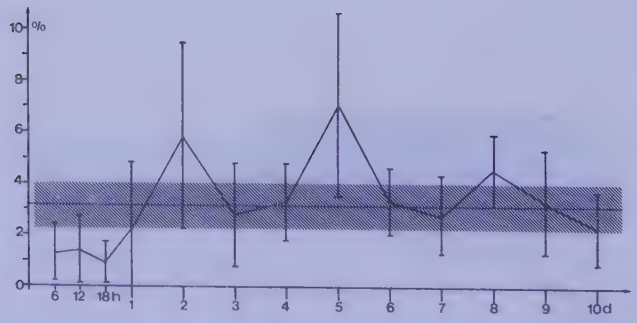
B = Tiere mit weniger als 3 % neutrophilen Granulozyten

Abb. 13 :

MITOSEN

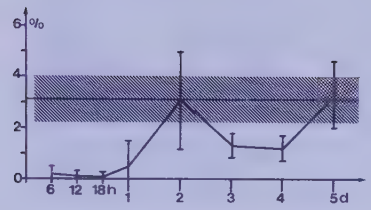


a: 0.5 ml Coronaviruslösung i.p.

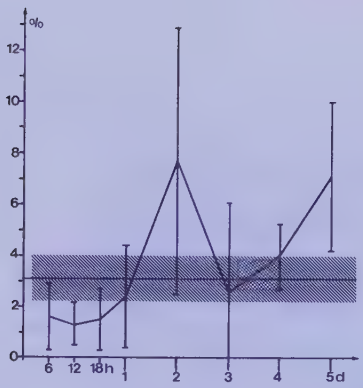


b: 0.5 ml 2%iges Kälberserum i.p.

Abb. 13 :



c: 1.0 ml sterile Luft i.p.



d: 0.5 ml physiologische Kochsalzlösung i.p.

Abb. 14 a :

Auftreten von "Intermediärformen". Schwierige Differenzierung zwischen Lymphozyten und monozytären Makrophagen.

1 = Lymphozyten
2 = Lymphatische Reizformen
3 = Lympho-monozytoide Intermediärformen
4 = Monozytäre Makrophagen Typ B

(12 Stunden nach i.p. Serumapplikation)

MGG x950

Abb. 14 b :

L.R. = Lymphozytäre Reizform mit intrazytoplasmatischen basophilen Granula

E.G. = Eosinophiler Granulozyt

N.G. = Neutrophiler Granulozyt

(6 Stunden nach i.p. Luftapplikation)

MGG x950

Abb. 14 a :

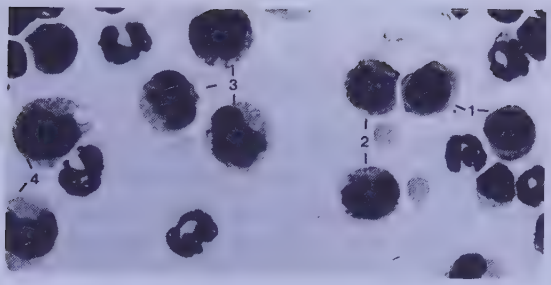
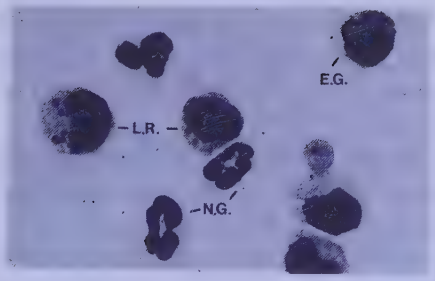


Abb. 14 b :



Das Auftreten dieser "Intermediärformen" wird allerdings nur kurzfristig beobachtet. In den Gruppen S und N innerhalb der ersten 24 Stunden. Die Gruppe L zeigt nur in den ersten 12 Stunden diese Zwischenform, besonders intensiv nach 6 Stunden. In der Gruppe V treten sie vereinzelt innerhalb der ersten 6 Stunden auf.

Sporadisch finden sich im Spektrum der freien Peritonealzellen einiger Tiere verschiedener Versuchsgruppen Peritonealmakrophagen mit runden bis ovalen Kernen, deren Struktur sich jedoch von den Makrophagen des Typs A unterscheidet. Das Chromatingerüst ist von weitaus geringerer Dichte sowie von feinretikulärer Struktur. Insgesamt färbt sich der etwas größere Kern auch weniger intensiv rotviolett an. Auffallend sind die ca. 7 bis 12 dunklen, deutlich erkennbaren Nukleolen (Abb. 15). Es besteht eine auffallende Ähnlichkeit in Form, Farbe und Struktur zu den fixen Zellen des Peritoneum parietale (Abb. 21, 23). Wesentlich häufiger finden sich jedoch zusammenhängende Verbände dieser Zellen (Abb. 16).

Bei allen Gruppen wird in den ersten 2 bis 3 Tagen eine vermehrte phagozytierende Aktivität der monozytären Zellen beobachtet, die in der Gruppe V besonders stark und früh auftritt. Bei dem phagozytierten Material handelt es sich wahrscheinlich um Granulozyten, da man deren Struktur bzw. eosinophile Granula im Zytoplasma der Makrophagen noch erkennen kann (Abb. 17).

Häufig findet man in den Präparaten eine rosettenförmige Anordnung mehrerer Makrophagen um einen Kernrest. Die Phagozyten dürften bereits in vivo festen Kontakt zu dem zentralen Zelltrümmer haben, da trotz Zentrifugation diese Konstellation erhalten bleibt (Abb. 18).

Erwähnenswert ist noch, daß man bei vielen Granulozyten der männlichen NMRI-Mäuse drumstickartige Anhängsel erkennen kann, die an die Chromatinverdichtungen denken lassen, wie sie bei segmentierten Leukozyten weiblicher Personen als sogenannte Trommelschlegelfortsätze gefunden werden (Abb. 5).

Abb. 15 a :

Vereinzelt finden sich in den Präparaten größere rund- bis ovalkernige Zellen mit hellerer, feinretikulärer Chromatinstruktur und deutlich erkennbaren Nukleolen. Die Morphologie dieser Zellen ähnelt sehr der der fixen Zellen des Peritoneum parietale (Vgl. Abb. 15b, 16, 21, 23).

MGG x950

Abb. 15 b :

Einzelne losgelöste Mesothelzelle des Peritoneum parietale (Mz).

MGG x1500

Abb. 15 a :

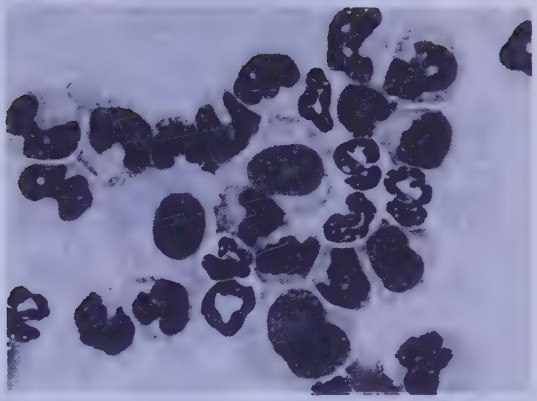
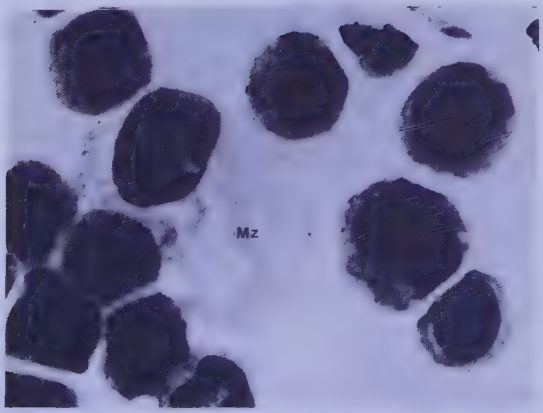


Abb. 15 b :



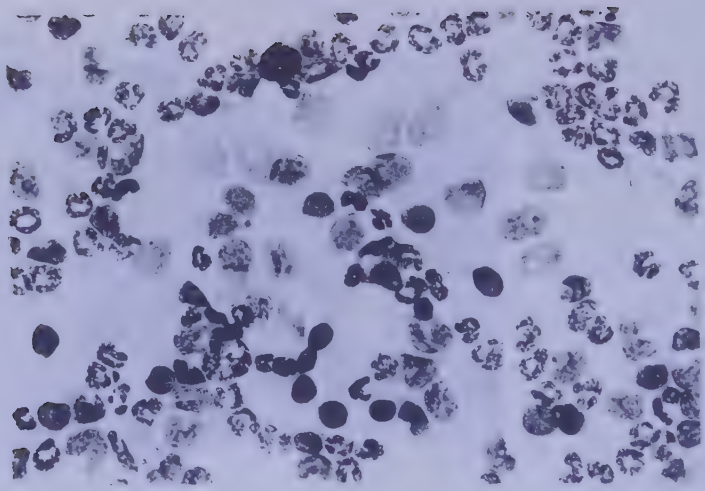


Abb. 16 :

Durch Punktion oder Spülung artifiziell abgelöster zusammenhängender Mesothelverband des Peritoneum parietale.

MGG x600

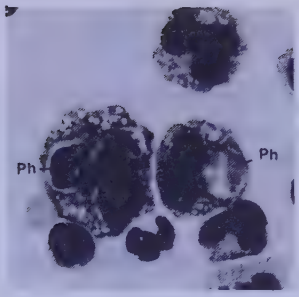


Abb. 17 :

Monozytäre Peritonealzellen mit Phagozytose (Ph).

MGG x950

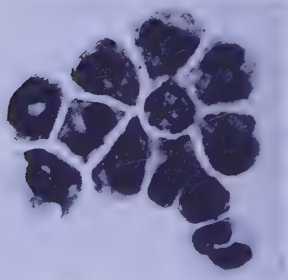


Abb. 18 :

Rosettenförmige Anordnung von Peritonealmakrophagen um einen degenerierten Kern.

MGG x950

3.3. Peroxidase - Reaktion

Im Zellspektrum der freien Zellen des Peritoneums unbehandelter Mäuse zeigen weder die Lymphozyten, noch die monozytären Makrophagen eine lichtmikroskopisch erkennbare positive Peroxidase - Reaktion. Lediglich 81.8 % der Granulozyten reagieren Pox-positiv. Die positiven Reaktionen sind von unterschiedlicher Stärke. In der Regel deutet bei der Hälfte der Zellen eine bräunliche Einfärbung des Zytoplasmas auf eine positive Reaktion hin, während bei der anderen Hälfte eindeutig grobe, bräunliche Granulationen erkennbar sind. Bei den restlichen 18.5 % der Granulozyten finden sich keine Hinweise auf eine Pox-positive Reaktion (Tab. 3).
Im Zellspektrum der freien Zellen des Peritoneums der Tiere, denen eine Virus-, Eiweiß- oder Kochsalzlösung bzw. sterile Luft intraperitoneal appliziert worden ist, lassen sich zu keiner Zeit Pox-positiv reagierende monozytäre Makrophagen nachweisen. Auch hier zeigt lediglich ein Teil der Granulozyten eine positive Aktivität. Während diese in den ersten 24 bis 48 Stunden p.i. insgesamt nur schwach ist, d.h. meist nur in einer bräunlichen Färbung des Zytoplasmas besteht, weisen die positiv reagierenden Granulozyten ca. ab dem 3. Tag p.i. besonders in der Gruppe L vermehrt goldgelbe bis dunkelbraune Granula auf (Abb. 19). Vergleicht man bei den einzelnen Versuchstieren das prozentuale Verhältnis der Pox-positiv bzw. Pox-negativ reagierenden Granulozyten mit dem prozentualen Verhältnis der neutrophilen bzw. eosinophilen Granulozyten im entsprechenden MGG-Präparat, so ergibt sich in den meisten Fällen eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit dem Anteil Pox-positiver und dem eosinophiler Granulozyten (Tab. 4). Auffallend jedoch ist, daß in den Gruppen V, S und N 18 bzw. 24 Stunden p.i. nur selten ein Pox-positiver Granulozyt aufzufinden ist, obwohl im MGG-Vergleichspräparat eosinophile Granulozyten vorhanden sind (Tab. 5).

Tier-Nr.	Granulozyten in % 0	+	++
1	13	47	40
2	36	42	22
3	40	34	26
4	10	14	76
5	28	34	38
6	10	43	47
7	12	44	44
9	15	60	25
11	6	40	54
12	15	41	44
$\bar{x}$	18.5	39.9	41.9

0 = Pox-negative Reaktion
+ = schwach Pox-positiv, bräunliches Zytoplasma
++ = deutlich Pox-positiv, bräunliche Granulation

Tab. 3 :

Anteil Pox-positiver Granulozyten in unbehandelten NMRI - Mäusen.

Abb. 19 a :

Stark Pox-positive Granulozyten neben eindeutig Pox-negativen Granulozyten.

(2 Tage nach i.p. Luftapplikation)

Pox, Hämalaun x950

Abb. 19 b :

Intensiv stark positive Pox-Reaktion. Die Granulozyten sind ausgefüllt mit groben Granula, die im Lichtmikroskop goldbraun erscheinen.

(3 Tage nach i.p. Luftapplikation)

Pox, Hämalaun x600

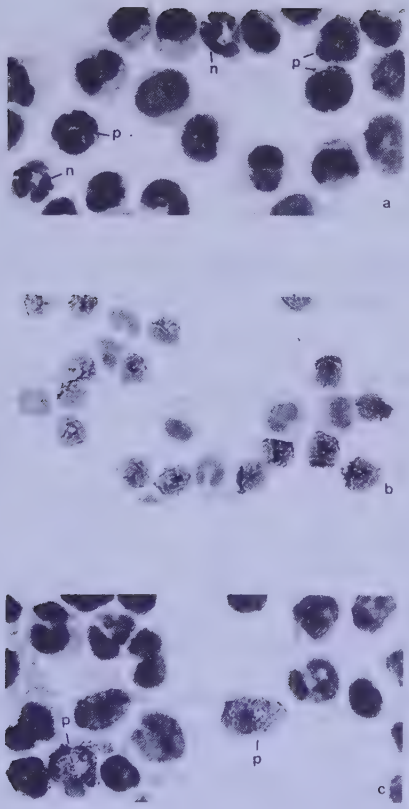
Abb. 19 c :

Mäßig starke Pox-positive Reaktion mit feinkörnigeren Granula.

(5 Tage nach i.p. Virusapplikation)

Pox, Hämalaun x950

Abb. 19 a - c :



n = Pox-negative Granulozyten

p = Pox-positive Granulozyten

Tier-Nr.	Pox-positive Granulozyten	%	Granulozyten Neutr.	Eosin.
2	0.3		98.6	1.4
3	0		96.2	3.8
4	2.0		98.7	1.3
5	0.3		98.9	1.1
6	0		98.9	1.1
7	0.3		98.4	1.6
8	0		98.6	1.4
10	1.3		95.2	4.8
11	0.7		99.5	0.5
12	0.7		99.0	1.0

Tab. 4 a : 6 Stunden nach i.p. Virusapplikation

Tier-Nr.	Pox-positive Granulozyten	%	Granulozyten Neutr.	Eosin.
1	0		99.3	0.7
2	0		100.0	0
3	0.3		100.0	0
4	4.1		95.2	4.8
5	0.7		100.0	0
6	5.7		96.6	3.4
10	0		95.4	4.6
11	0		98.0	2.0
12	0		99.5	0.5

Tab. 4 b : 12 Stunden nach i.p. Virusapplkation

Tier-Nr.	Pox-positive Granulozyten	%	Granulozyten Neutr.	Eosin.
1	9.7		45.7	54.3
3	7.7		94.9	5.1
4	9.1		88.1	11.9
5	18.0		78.7	21.3
6	26.0		70.0	30.0
7	32.8		55.6	44.4
8	34.0		69.0	31.0
11	27.7		81.7	18.6
12	13.0		75.0	25.0

Tab. 4 c : 48 Stunden nach i.p. Virusapplikation

Tier-Nr.	Pox-positive Granulozyten	%	Granulozyten Neutr.	Eosin.
1	48.8		28.9	71.1
2	53.1		39.8	60.2
4	67.6		35.7	64.9
5	88.7		11.2	88.8
6	74.5		27.0	73.0
7	67.6		16.7	83.3
8	61.3		25.0	75.0
9	57.5		40.8	59.2
10	85.2		11.1	88.9
11	79.9		18.2	81.2
12	66.6		36.2	63.8

Tab. 4 d : 2 Tage nach i.p. Luftapplikation

Tier-Nr.	Pox-positive Granulozyten	%	Granulozyten Neutr.	Eosin.
1	92.3		6.3	93.7
2	97.3		16.7	83.3
3	98.9		2.3	97.7
4	99.7		0.9	99.1
5	16.8		90.0	10.0
6	99.4		1.4	98.6
7	97.1		10.6	89.4
8	98.0		13.0	87.0
10	98.9		3.4	96.6
11	98.8		3.5	96.5
12	99.7		1.9	98.1

Tab. 4 e : 3 Tage nach i.p. Luftapplikation

Tier-Nr.	Pox-positive Granulozyten	%	Granulozyten Neutr.	Eosin.
1	0		95.2	4.8
2	0		91.9	8.9
3	1.0		94.5	5.5
4	0		96.1	3.9
5	0		90.3	9.7
6	0		94.1	5.9
8	0		84.5	15.5
10	0.3		99.0	1.0
11	0		93.0	7.0

Tab. 5 a : 24 Stunden nach i.p. Virusapplikation

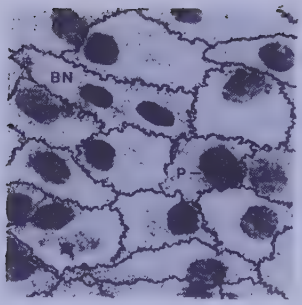
Tier-Nr.	Pox-positive Granulozyten	%	Granulozyten Neutr.	Eosin.
1	0		96.0	4.0
2	17.4		58.8	41.2
3	0		90.6	9.4
5	3.0		93.4	6.6
6	16.0		86.2	13.8
7	0		79.1	20.9
8	0		84.9	15.1
9	0		92.0	8.0
10	0		90.1	9.9
11	0		96.2	3.9
12	0		91.9	8.1

Tab. 5 b : 24 Stunden nach i.p. Serumapplikation

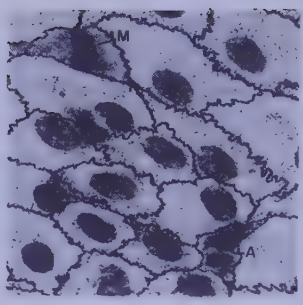
Entsprechende Vergleiche mit den Zellen des peripheren Blutes lassen sich nicht anstellen, da hier eine deutliche Granulozytopenie vorliegt. Der dominierende Anteil der Lymphozyten zeigt auch hier keine Pox-positive Reaktion. Neutrophile Granulozyten und Monozyten finden sich selten, doch können in einigen dieser Zellen Pox-positive Granula beobachtet werden.

3.4. Fixe Zellen des Peritoneum parietale

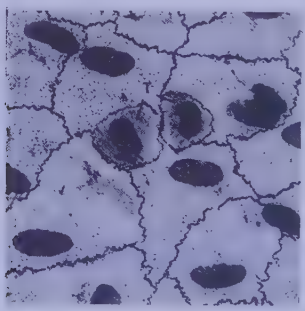
Die Häutchenpräparate der vier Versuchsgruppen zeigen in der Verlaufsbeobachtung lediglich eine Vermehrung der Kernteilungsfiguren am 5. Tag p.i.. Dabei werden vorwiegend zweikernige Zellen gefunden, andere mitotische Figuren sind selten. Innerhalb einer Versuchsgruppe liegen hier jedoch oft individuelle sowie innerhalb eines Präparates auch regionale Verteilungsunterschiede vor (Abb. 20).
Die Präparation des einschichtigen Peritoneum parietale ermöglicht außerdem eine Reihe von allgemeinen morphologischen Beobachtungen:
Die Mesothelzellen des Peritoneum parietale stellen sich als zusammenhängender einschichtiger Zellverband dar. Die Versilberung der Zellgrenzen läßt eine deutliche Polymorphie der asymetrisch angeordneten Mesothelzellen erkennen. Die hellen rotvioletten Kerne mit ihrer feinretikulären Chromatinstruktur liegen meist exzentrisch und zeigen teilweise mehrere gut erkennbare Nukleolen. Die Kerne sind rund bis oval, teils auch leicht eingedellt. Auffällig ist das stellenweise paarartige Zusammenliegen von benachbarten Kernen. Darüberhinaus finden sich gelegentlich Zellen, die offensichtlich außerhalb des Mesothelverbandes liegen. Deren Kerne sind klein und von dunklerer Struktur, ihr Zytoplasma schmal und dunkel (Abb. 21).
Die argyrophilen Zellgrenzen haben meist einen welligen Verlauf. Einige Zellen weisen eine besonders ausgeprägte Schlängelung ihrer Zellgrenzen auf. Stellenweise ist die Kontinuität der argy-



a



b



c

Abb. 20 a - c :

Kernteilungsfiguren im Peritoneum parietale.

P = Prophase

BN = Binukleäre Zelle

M = Metaphase

A = Anaphase

T = Telophase mit Zytokinese

MGG, Silbernitrat x600

Abb. 21 a - c :

Geschlossener einschichtiger Mesothelzellverband des Peritoneum parietale der weißen NMRI - Maus.
Die Schlängelung der Zellgrenzen ist teils besonders stark (b), teils nur gering ausgeprägt (c).
Das Mesothel wird gelegentlich durch nicht ortsständige Zellen überlagert (O).
An einigen Stellen liegen benachbarte Mesothelkerne paarartig zusammen (X).

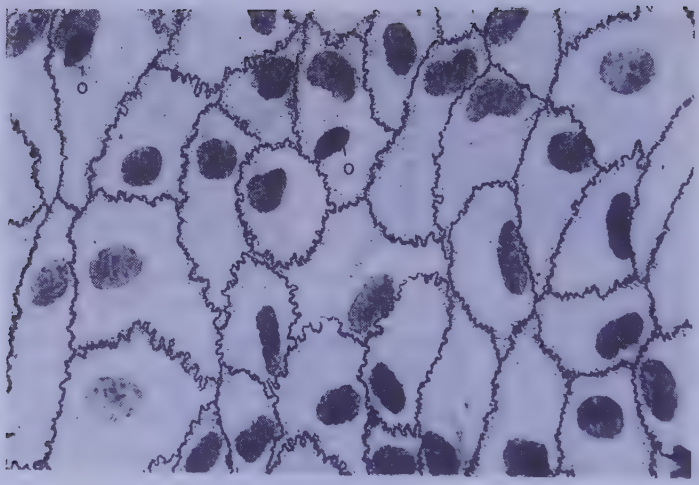
MGG, Silbernitrat x600

Abb. 21 d :

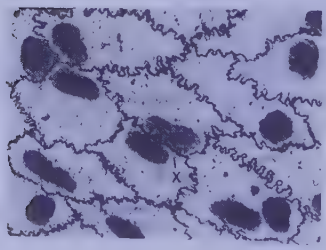
Die Kontinuität der Zellgrenzen ist stellenweise durch fehlende Versilberung der Grenzlinien unterbrochen (⟶).

MGG, Silbernitrat x950

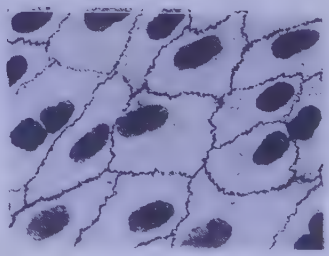
Abb. 21 :



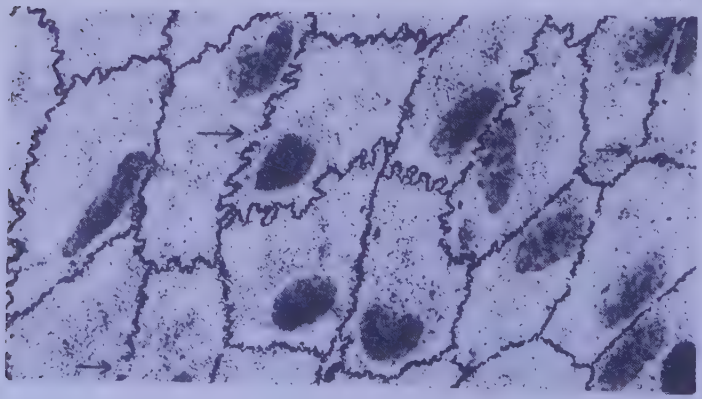
a



b



c



d

rophilen Grenzlinien durch Lücken unterbrochen (Abb. 21). Vereinzelt finden sich Mesothelbezirke, in denen die Zellgrenzen verbreitert und unscharf erscheinen. Wie Abbildung 22 zeigt, ist auf den Begrenzungslinien eine feine argyrophile Granulation zu erkennen.
Außerdem finden sich an einigen Stellen des Peritoneum parietale Öffnungen zwischen den Mesothelzellen. In diesen Öffnungen liegen zumeist Erythrozyten. Weiterhin finden sich innerhalb der Zellgrenzen kugelige "Silberdepots", die den Zellgrenzen ein perlschnurartiges Aussehen verleihen. Gleichartige "Silberdepots" sind auch im Zytoplasma zu erkennen (Abb. 23).
In der Gruppe der unbehandelten Mäuse sieht man vereinzelt kleine Defekte des Mesothelverbandes. In den Häutchenpräparaten der behandelten Tiere finden sich dagegen deutlich häufiger unterschiedlich große Bezirke, in denen sich die Zellgrenzen nicht oder nur schwach darstellen lassen. Hier sind die Zellkerne meist pyknotisch (Abb. 24).
Vorwiegend im Umfeld solcher Defekte, aber auch an anderen Stellen im intakten Mesothelverband sind Zellen zu erkennen, deren Zytoplasma teils vollständig, teils nur perinukleär homogene bis fein vakuoläre argyrophile Strukturen beinhalten. Die Kerne dieser Zellen sind teilweise unverändert und weisen lediglich eine verdickte argyrophile Kernmembran auf. Ansonsten erscheinen die Zellkerne verkleinert, unförmig und pyknotisch (Abb. 25).
Betrachtet man die Häutchenpräparate in der Übersichtsvergrößerung, so fallen dunkle lineare, parallel verlaufende Streifungen im Zellverband auf. Wie aus der topographischen Beziehung dieser Streifungen zu Teilen des Sternums und der Rektusscheide in der Mitte der Häutchenpräparate zu erkennen ist, läßt sich die Verlaufsrichtung dieser Streifungen von oben außen nach unten innen bestimmen (Abb. 26, 27). Bei entsprechender Vergrößerung ergeben sich zwei Ursachen für diese Streifungen:

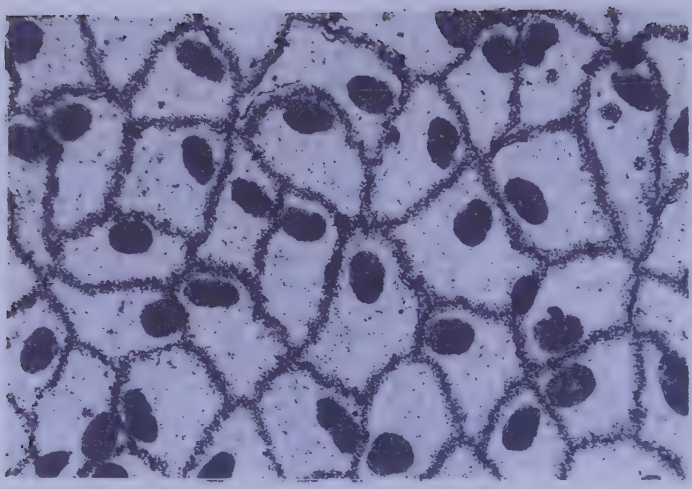


Abb. 22 :

Mesothelzellen mit breiten, unscharfen, feingranulierten Zellgrenzen.

MGG, Silbernitrat x600

Abb. 23 a :

Porenartige Öffnungen innerhalb der Mesothelzellgrenzen, z.T. ausgefüllt mit Erythrozyten.
Inset: Größere argyrophil begrenzte Öffnung im Zellverband.

(5 Tage nach i.p. Luftinjektion)

MGG, Silbernitrat x600

Abb. 23 b :

Perlschnurartige argyrophile dichte Strukturen im Bereich der Zellgrenzen.

(3 Tage nach i.p. Seruminjektion)

MGG, Silbernitrat x600

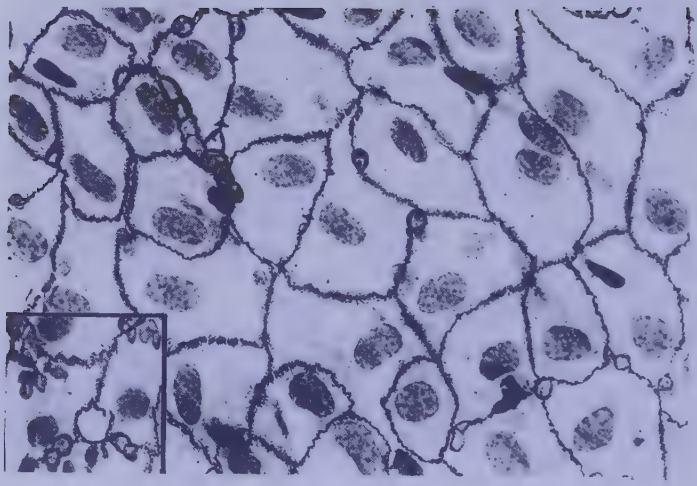
Abb. 23 c :

Rundliche argyrophile Strukturen im Bereich der Zellgrenzen sowie innerhalb des Zytoplasmas.

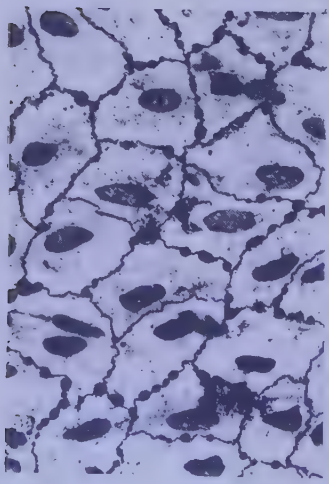
(3 Tage nach i.p. Seruminjektion)

MGG, Silbernitrat x950

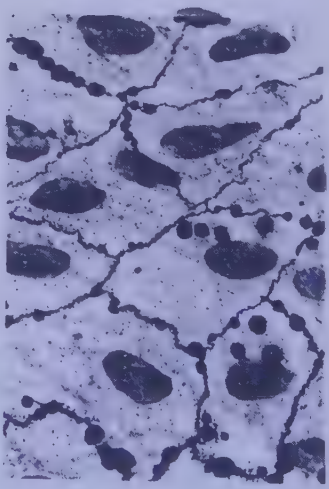
Abb. 23 :



a



b



c

Abb. 24 a :

Größerer Mesothelzellenbezirk mit nicht oder schwach darstellbaren Zellgrenzen. Die Kerne zeigen pyknotische Veränderungen.
(3 Tage nach i.p. Seruminjektion)

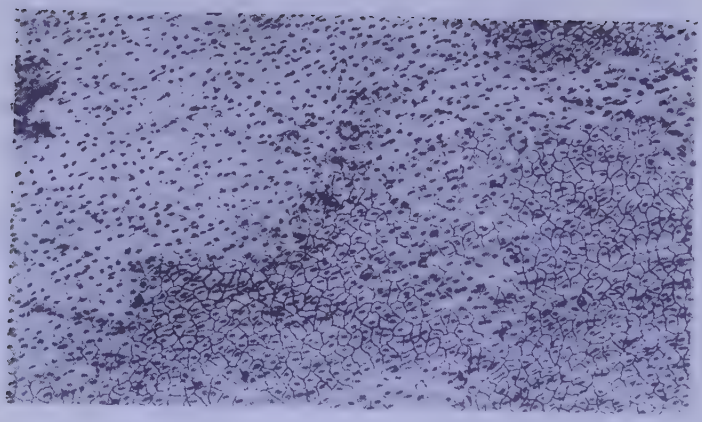
MGG, Silbernitrat x95

Abb. 24 b :

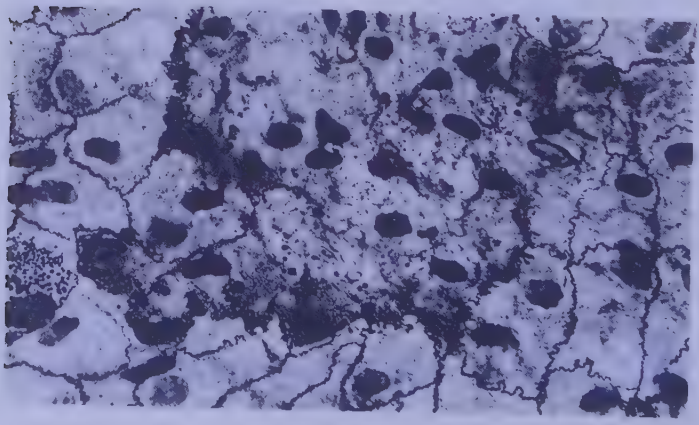
Defektstelle im Mesothelzellverband mit nicht darstellbaren Zellgrenzen, degenerativ veränderten Zellkernen und argyrophilen Mesothelzellen.
(3 Tage nach i.p. Luftinjektion)

MGG, Silbernitrat x600

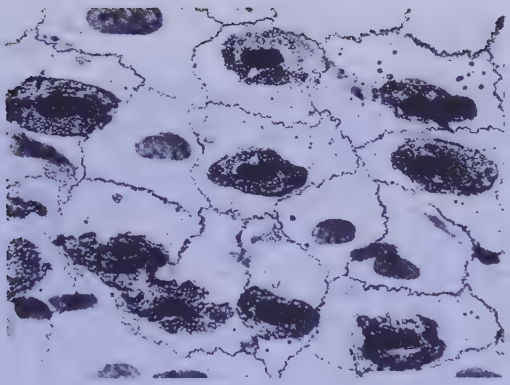
Abb. 24 a,b :



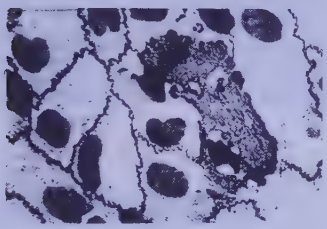
a



b



a



b

Abb. 25 a :

Mesothelzellen mit perinukleären feinvakuolären argyrophilen Strukturen.

MGG, Silbernitrat x600

Abb. 25 b :

Mesothelzellen mit homogen argyrophilem Zytoplasma. Kerne stark pyknotisch verändert.

MGG, Silbernitrat x600

Abb. 26 a :

Parallel verlaufende streifenförmige sowie nestartig angeordnete Zellareale kleiner Mesothelien.

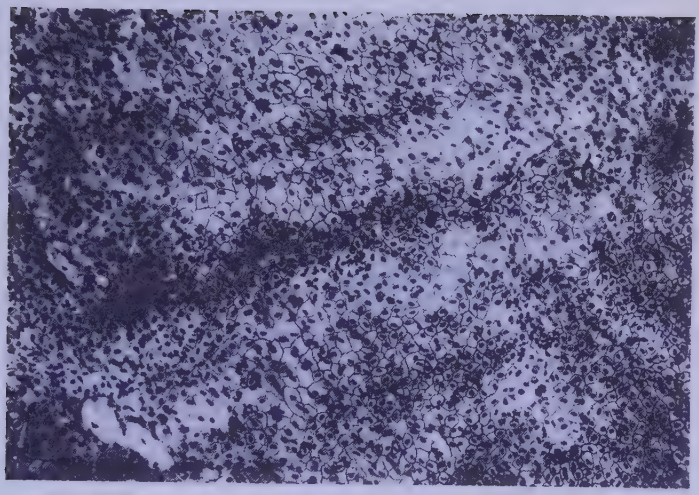
MGG, Silbernitrat x95

Abb. 26 b :

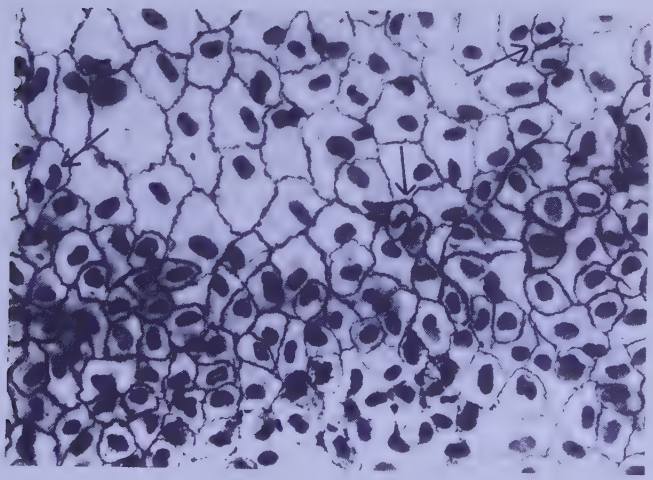
Ausschnitt aus Abb. 26a:
In den dicht beieinander liegenden Mesothelzellen sind gehäuft Kernteilungsfiguren zu beobachten (⟶).

MGG, Silbernitrat x360

Abb. 26 :



a



b

Abb. 27 a :

Parallel verlaufende "Silberzellstraßen": Mesothelzellen mit argyrophilem Zytoplasma; Kerne teilweise degenerativ verändert.

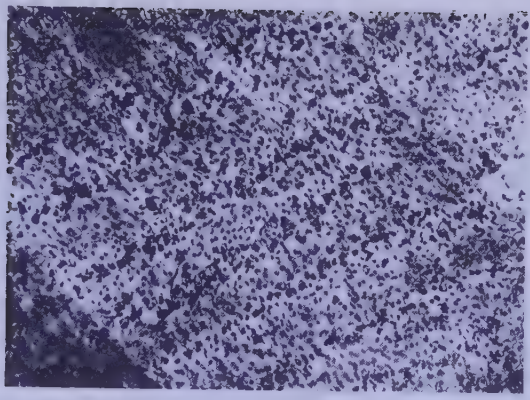
MGG, Silbernitrat x95

Abb. 27 b :

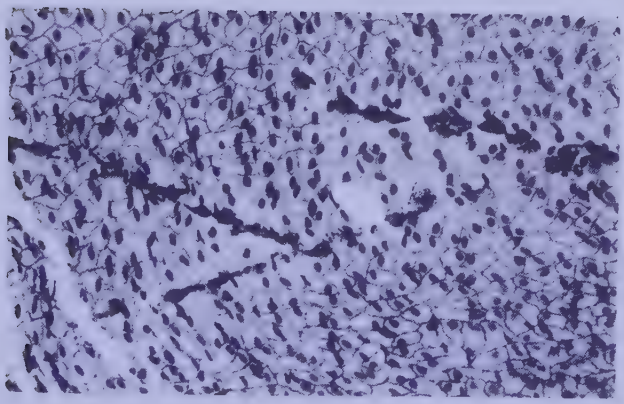
Willkürlich verlaufende "Silberzellstraßen". Kerne meist pyknotisch verändert.

MGG, Silbernitrat x150

Abb. 27 :



a



b

Einerseits sind diese Streifungen oder "Straßen" aus dicht beieinanderliegenden kleineren, fast rundlich begrenzten Mesothelzellen aufgebaut. Ihr Zytoplasma färbt sich dunkler an. Mitotische Figuren sind hier häufiger. Zwischen diesen Arealen liegen wiederum größere polymorphe Mesothelzellen. Neben diesen "Straßen" kleiner Mesothelien finden sich aber auch Nester dichter Zellen (Abb. 26).
Andererseits finden sich als Ursache für diese Streifungen hintereinander angeordnete argyrophile Zellen. Diese Streifungen sind jedoch schmäler. Das Zytoplasma ist ausgefüllt mit homogenem bis fein vakuolärem argyrophilem Material. Auch die Kerne dieser argyrophilen Zellen sind entweder von einer dickeren argyrophilen Membran umgeben oder degenerativ verändert (Abb. 27a). Es werden aber auch lineare Anordnungen von Silberzellen beobachtet, die willkürlich und gegensinnig zu den oben genannten verlaufen (Abb. 27b).

4. Diskussion

Granulozyten sind im Cavum peritonei nur bei Entzündungen in großer Anzahl zu beobachten, während lymphatische und monozytäre Elemente auch unter physiologischen Bedingungen in der freien Bauchhöhle zu finden sind (FRUHMAN, 1959; BENNETT, 1965). Dabei werden auch monozytäre Zellformen beobachtet, die weder den Lymphozyten noch den monozytären Makrophagen eindeutig zugeordnet werden können. Sie werden als "lymphocyte-macrophage intermediates (MIMS, 1964), "Intermediärzellen" (FORBES, 1965, 1966), "Übergangszellen" oder "monozytoide Mononukleäre" (LOKAY u. FEIT, 1968) und als "Borderline-Cells" bzw. "intermediate-forms" (CARR, 1967, 1969) bezeichnet. JOOS et al. (1969) sehen neben kleinen Lymphozyten und monozytoiden Zellen mit nierenförmigem Kern noch drei weitere Formen, nämlich größere lymphoide Zellen, lymphomonozytoide Zellen und monozytoide Zellen mit rundem Kern. Untersuchungen im Elektronenmikroskop sowie mittels Coulter Counter und Channelyzer lassen ABE et al. (1979) und HONMA et al. (1980) die Peritonealzellen in nur drei Typen einteilen: Lymphozyten, "Medium-sized round mononuclear cells" und Makrophagen.

Die freien Peritonealzellen unbehandelter weißer NMRI-Mäuse lassen sich lichtmikroskopisch in verschiedene Zelltypen einteilen. Das von JOOS et al. (1969) angeführte Klassifizierungsschema halten wir jedoch wegen der mangelnden Eindeutigkeit der Zuordnung zu diesen einzelnen Zellformen für kaum anwendbar. Nach unseren Erfahrungen lassen sich Lymphozyten von Makrophagen gut unterscheiden, wobei letztere aufgrund ihrer Kernform noch in drei Typen unterteilt werden können. Sie könnten unseres Erachtens die verschiedenen Stadien eines Differenzierungsvorganges dieser Makrophagen darstellen, da eine Peritonitis eine prozentuale Umverteilung innerhalb der drei Makrophagentypen im Sinne einer sog. "Linksverschiebung"

bewirkt. In den ersten 24 Stunden nach Erzeugung einer peritonealen Reizung haben wir jedoch auch Zellformen beobachten können, die an die erwähnten "Intermediärformen" erinnern. Diese "lymphomonozytoiden" Zellen ähneln sehr jenen Reizformen, die bei Virusinfektionen, insbesondere bei der infektiösen Mononukleose beim Menschen in klassischer Weise beobachtet werden (UNDRITZ, 1972). Wir haben diese Zellen wegen ihres unregelmäßigen Auftretens einerseits und wegen ihres Formenreichtums andererseits nicht als eigene Zellpopulation abgrenzen können. Sie wurden den Makrophagen des Typs B zugeordnet, denen sie morphologisch nahezu gleich sind. Sie stellen somit einen zwar unbekannten, wegen ihrer geringen Zahl aber unbedeutenden Anteil dieser Gruppe dar.

Hinsichtlich der H e r k u n f t d e r f r e i e n P e r i t o n e a l z e l l e n lassen sich folgende Möglichkeiten diskutieren:

a) Einstrom monozytärer Zellen aus Blut und Knochenmark,
b) Bildung von freien Makrophagen aus ortsständigen Zellen der Bauchhöhle,
c) Proliferation von intrakavitären Makrophagen,
d) Transformation lymphatischer Zellen in monozytäre Makrophagen.

Eine vorwiegend myeloische Herkunft der freien Peritonealmakrophagen wird von vielen Autoren diskutiert (MARCHAND, 1899; VAN FURTH et al., 1970; PARWARESCH et al., 1971; PFITZER, 1973; MARSAN u. CAYPHAS, 1974; DAEMS u. KOERTEN, 1978; OGAWA et al., 1978; ABE et al., 1979; HONMA et al., 1980). VAN FURTH et al. (1970) identifizierte die nach Erzeugung einer Peritonitis in die Bauchhöhle einwandernden monozytären Makrophagen mittels der Peroxidasereaktion als Zellen myeloischer Herkunft. Im Gegensatz dazu konnten wir bei keinem Tier und zu keiner Zeit Peroxidase-positive monozytäre Peritonealzellen erkennen. Allerdings zeigte auch nur ein Teil der polymorphkernigen Granulozyten eine positive Reaktion. Vermutlich handelt es sich da-

bei um die eosinophilen Granulozyten , die ein Mehrfaches an Peroxidase besitzen, welche sich darüberhinaus von der der neutrophilen Granulozyten biochemisch unterscheidet (ABE et al., 1979; WELLER u. GOETZL, 1980). Wir vermuten, daß es im Rahmen der zellulären Abwehrmaßnahmen nach Eintritt in die Bauchhöhle rasch zu einem Aktivitätsverlußt kommt, denn auch VAN FURTH et al. (1970) registrierten mit zunehmender Kulturdauer und zunehmendem Abstand vom Injektionszeitpunkt einen Abfall der Peroxidaseaktivität der Peritonealmakrophagen. Ferner ist zu berücksichtigen, daß unterschiedliche Methoden der Peroxidasereaktion, der Auswertung und verschiedene Tierstämme zum Einsatz kamen. Dies könnte die unterschiedlichen quantitativen und qualitativen Ergebnisse erklären (SCHAEFER u. FISCHER, 1968; VAN FURTH et al., 1970; LEDER u. STUTTE, 1975; DAEMS u. KOERTEN, 1978; OGAWA et al., 1978; ABE et al., 1979).

Neben dem Einwandern monozytärer Zellen aus Blut und Knochenmark wird von einigen Autoren auch die Bildung freier Makrophagen aus ortsständigen Zellen diskutiert. ARONSON u. SHAHAR (1965) vermuten, daß ortsständige Zellen des Omentums und Mesenteriums proliferieren, um dann als Makrophagen ins Cavum peritonei überzutreten. JOOS et al. (1969) diskutieren die Möglichkeit, daß es sich bei den monozytoiden Zellen mit rundem Kern um abgelöste Peritonealmesothelien handeln könnte. MOHR et al. (1971a,c,d, 1972a-c) beschreiben eine hohe Proliferationsrate der perivaskulären und submesothelialen Histiozyten und der Mesothelien der Ratte, die dann als freie Makrophagen in die Bauchhöhle abwandern. Morphologische Zwischenstadien einer Transformation von Mesothelzellen in Makrophagen beschrieben EFRATI u. NIR (1976).

Aus unseren Untersuchungen ergeben sich Hinweise für die Vermutung von JOOS et al. (1969) , daß es sich bei den monozytoiden Zellen mit rundem Kern um abgelöste Mesothelien handelt. Bei einigen Versuchstieren konnten wir rundkernige, zytoplas-

mareiche monozytäre Zellen vereinzelt oder gehäuft entdecken, deren Kerne sich morphologisch von den übrigen Makrophagen unterscheiden und eine auffallende Ähnlichkeit mit den fixen Zellen des Peritoneum parietale besitzen wie sie als größere zusammenhängende Zellverbände infolge der artifiziellen Abschilferung in jedem Präparat zu finden sind. Möglicherweise handelt es sich auch bei den anderen rund- bis ovalkernigen Makrophagen vom Typ A um losgelöste aktivierte Mesothelzellen, bei denen es nach Austritt aus dem Verband zu einer Kernstrukturänderung kommt, die sich dann in den Pappenheimfärbung dichter und grobretikulärer darstellt.

Kinetische Untersuchungen über die Mitoserate freier Peritonealzellen zeigen, daß die intrakavitäre Proliferation von Makrophagen nur eine geringe quantitative Bedeutung hat (MOHR et al., 1971a-c, 1972a,c; FORBES, 1965, 1966; JOOS et al., 1969; MURCH u. PAPADIMITRIOU, 1981). Auch unsere Untersuchungen bestätigen, daß die mitotische Vermehrung nur einen geringen Beitrag zu einer initialen Makrophagenvermehrung leisten kann, da der prozentuale Anteil an Kernteilungsfiguren gering ist. Neben den verschiedenen Formen der regelrechten Kern- und Zellteilung, beobachteten wir auch Zellen mit zwei oder mehreren Kernen. Meistens sind die Kerne völlig voneinander getrennt. Vereinzelt finden sich jedoch auch hantelförmige Kerne mit internukleären Chromatinbrücken. Bei den zweikernigen Zellen sowie den gelegentlich auftretenden hantelförmigen Kernen handelt es sich um Formen einer mitotischen Hemmung, wie sie zunehmend in Geweben höherer Differenzierung beobachtet werden (PFITZER, 1980). Während echte "amitotische" Kernteilungen in den meisten Geweben höherer Organismen auszuschliessen sind, bilden Alveolarmakrophagen eine seltene Ausnahme (PFITZER, 1970). Im Peritoneum können ebenfalls Zellen mit einer solchen "amitotischen" Segmentierung beobachtet werden, wobei es sich um Abkömmlinge der Blutmonozyten handeln dürfte.

Bis heute umstritten ist die Frage nach der Möglichkeit einer Transformation von lymphatischen Zellen in monozytäre Makropha-

gen. Das Auftreten "lymphomonozytoider" Intermediärformen gibt vielen Autoren Anlaß zu dieser Vermutung (MARCHAND, 1899; MIMS, 1964; FORBES, 1965, 1966; LOKAY u. FEIT, 1968; CARR, 1967, 1969). Laut JOOS et al. (1969) lassen sich die größeren lymphoiden Zellen, die lymphomonozytoiden Zellen sowie die monozytoiden Zellen mit rundem Kern im Blut der Maus unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisen. Die Autoren diskutieren deshalb eine extravaskuläre Transformation bei hämatogener Herkunft. Eine Transformation von lymphatischen Zellen des Ductus thoracicus in Makrophagen beobachten BOAK et al. (1968) bei Mäusen. ABE et al. (1979) und HONMA et al. (1980) erscheinen die "Medium-sized round mononuclear cells" morphologisch zwar als eine Übergangsform, doch sehen sie den metamorphotischen Vorgang als nicht erwiesen an. In der Tat erwecken die auch von uns beobachteten "lymphomonozytoiden" Reiz- und Zwischenformen den Eindruck, als vollziehe sich hier die oft diskutierte, aber bislang nicht bewiesene Transformation von Lymphozyten in monozytäre Makrophagen. CARR (1967) beobachtete größere dunkelblaue Granula im Zytoplasma lymphatischer Zellen, die er als phagozytierte Granula deutete. JOOS et al. (1969) beschreiben die vereinzelte Aufnahme von kleinen Polystyren-Latexpartikeln durch lymphatische Zellen, so daß eine phagozytierende Potenz offensichtlich auch diesen Zellen gegeben ist.
Aufgrund der derzeitigen Erkenntnisse ist anzunehmen, daß die Makrophagen im Cavum peritonei eine heterogene Population darstellen und unterschiedlicher Herkunft sind (JOOS et al., 1969; DAEMS u. KOERTEN, 1978; OGAWA et al., 1978). Insbesondere bei peritonitischer Reizung werden Zellen mobilisiert, die den Gesamtmakrophagenpool bilden.

Intraperitoneale Injektionen einer Coronaviruslösung, einer 2 %igen Kälberserumlösung, einer 0.8 %igen Kochsalzlösung sowie die intraperitoneale Applikation von steril gefilterter

Luft bewirken signifikante Umverteilungen des normalen Zellspektrums im Cavum peritonei der Maus. Trotz der Verschiedenheit der vier applizierten Agentien sind die zellulären Reaktionen in der Bauchhöhle in den ersten 24 Stunden gleich. Wie die intraperitoneale Injektion von Bakterien (FRUHMAN, 1959; MOHR et al., 1971b), Endotoxin (FORBES, 1965; MOHR et al., 1972a), Rinderserum (MOHR et al., 1972b), Phytohämagglutinin (MOHR et al., 1970d, 1971e), Erythrozyten (MOHR et al., 1970a,c), Protaminsulfat (BENEKE et al., 1970), Paraffinöl (PARWARESCH et al., 1971) und anderer organischer Substanzen (DAEMS u. KOERTEN, 1978) führt auch die einer Coronavirus- und fetalen Eiweißlösung sowie steriler Luft zu einem frühen Einstrom neutrophiler Granulozyten. Vermutlich beginnt bereits 30 Minuten nach der Injektion der Neutrophileneinstrom (COURTICE et al., 1953; JOOS et al., 1969; MOHR et al., 1972a). Obwohl der realtive Anteil der Neutrophilen nach der 6. Stunde p.i. stark abnimmt, kommt es in dieser Zeit zu einer weiteren absoluten Vermehrung der neutrophilen Granulozyten. Ursache der stark abfallenden Prozentkurve muß demnach eine unmittelbar nach dem Neutrophileneinstrom einsetzende erhebliche Zunahme der monozytären Makrophagen sein. Dies erklärt auch die relative Umverteilung der einzelnen Makrophagentypen. Sechs Stunden nach i.p. Applikation kommt es zu einem maximalen prozentualen Abfall der Makrophagen des Typs C. Im Gegenzug dazu zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Makrophagen des Typs B sowie ein weniger deutlicher Anstieg der Makrophagen des Typs A und der Lymphozyten. Bei konstant bleibender Anzahl der Makrophagen könnten beide Veränderungen nur durch einen isolierten Untergang der Makrophagen des Typs C erklärt werden. Da aber bei der Durchmusterung der Präparate weder ein gehäuftes Auftreten degenerierter monozytärer Zellen noch deren Zelltrümmer beobachtet wurde, ist dies unwahrscheinlich. Somit wird diese prozentuale Umverteilung am besten durch eine absolute Vermehrung der monozytären Makrophagen erklärt (FORBES, 1965, 1966; JOOS et al., 1969; PARWARESCH et al, 1971;

DAEMS u. KOERTEN, 1978; STEER u. LEWIS, 1983). Dabei kommt es zu einer starken Vermehrung der Makrophagen des Typs B und A während der ersten sechs Stunden. Die von der 6. Stunde p.i. an bei den einzelnen Versuchsgruppen unterschiedlich schnell einsetzende Rückbildung der Verhältnisse könnte damit erklärt werden, daß die Makrophagen des Typs A und B sich in solche des Typs C differenzieren. Alternativ wäre denkbar, daß der Typ C eine eigenständige Zellinie darstellt, die etwas verspätet, dann aber besonders zahlreich in die Bauchhöhle einwandert.
Die in den vier Versuchsgruppen anfänglich unterschiedliche Erhöhung der Lymphozytenwerte deutet darauf hin, daß auch lymphatische Zellen initial vermehrt in die Bauchhöhle einströmen können (JOOS et al., 1969; PARWARESCH et al., 1971). Setzt man eine Transformation in "lymphomonozytoide" Intermediärformen voraus, so müssen die Lymphozyten zur Vermehrung der Makrophagen des Typs B beitragen. Die ab dem 3. Tag p.i. besonders in der mit Coronavirus infizierten Gruppe deutlich erhöhten Lymphozytenwerte deuten darauf hin, daß es zu einer Auseinandersetzung des Wirtsorganismus mit den Viren gekommen ist. Spezifische zellmorphologische Hinweise auf eine Virusinfektion liessen sich lichmikroskopisch jedoch nicht ausfindig machen. Die Ergebnisse der mit Kochsalz behandelten Gruppe zeigen, daß die einfache Injektion einer sterilen und pyrogenfreien physiologischen Salzlösung bei drei Viertel der Tiere ebenfalls eine granulozytäre Reaktion auslöst. Derartige Reaktionen zeigen sich ebenfalls nach Applikation von destilliertem Wasser oder einfacher Punktion mit einer sterilen Nadel (MOHR, 1970; MOHR et al., 1970d). Man kann annehmen, daß die Granulozytose durch verschleppte Keime und/oder Partikel, die sich auf dem Fell befinden, verursacht wird. Die Wirkung applizierter Teststoffe sowie die darauf folgende Immunantwort können dadurch in nicht unerheblicher Weise überlagert bzw. verfälscht werden, besonders wenn es sich um schwache Reize handelt. Damit würden auch die breiten Standardabweichungen der neutrophilen

Granulozyten in der Serumgruppe während der ersten 24 Stunden erklärt werden.
Die unterschiedlichen Rückbildungstendenzen der Verhältniszahlen bei den monozytären Makrophagen in den vier Versuchsgruppen geben Grund zu der Annahme, daß die Art und die Stärke der einzelnen applizierten Reize einen unterschiedlichen Einfluß auf die Mobilisierungs- bzw. Differenzierungsvorgänge dieser Zellen ausüben. Dies scheint auch von der Gegenwart polymorphkerniger Granulozyten abhängig zu sein. Einerseits weisen die mit Kochsalz behandelten Tiere ohne Neutrophilenreaktion keine Verschiebung im Makrophagenspektrum auf, andererseits aber führt der erneute Granulozyteneinstrom in Form von Eosinophilen in der mit Luft behandelten Gruppe zwischen dem 1. und 2. Tag p.i. nochmals zu einer Umverteilung der Makrophagenanteile, d.h. zum Anstieg des Typs A und zum deutlichen Abfall des Typs C.

Die Bedeutung der e o s i n o p h i l e n Granulozyten ist nach wie vor Gegenstand von Spekulationen. Das Spektrum an Krankheiten, die eine Eosinophilie auslösen können, ist breit (WELLER u. GOETZL, 1980). So können für die Entstehung einer Eosinophilie in Körperhöhlen bzw. Ergüßen mehr als 30 verschiedene Krankheiten verantwortlich sein (SULAVIK u. KATZ, 1963). Eine Eosinophilie der Peritonealflüssigkeit und des Blutes als Folge chronischer Peritonealdialyse beschreiben LEE u. SCHOEN (1967). Im Allgemeinen geht aber eine Eosinophilie der Ergüße nicht mit einer Bluteosinophilie einher (BEESON u. BASS, 1977; KOSS, 1979; VERESS et al., 1979; SAINI et al., 1980). Ein eosinophiler Pleuraerguß wird insbesondere auch nach Brustkorbverletzungen und nach Pneumothorax beobachtet (SCHWARTZ, 1914; SULAVIK u. KATZ, 1963; BEEKMAN et al., 1974; KUMAR et al., 1975; BEESON u. BASS, 1977; KOSS, 1979; VERESS et al., 1979; SAINI et al., 1980). Einen signifikanten Anstieg eosinophiler Granulozyten mit einem Maximum von 31 % am 3. Tag nach intraperitonealer Injektion steriler Luft stellt auch in unseren Untersuchungen ein auffälliges Ergebnis dar. Berück-

sichtigt man, daß es in den ersten 24 bis 48 Stunden p.i. bereits zu einer massiven absoluten Vermehrung neutrophiler und monozytärer Zellen kommt, so zeigt der sofort einsetzende prozentuale Anstieg der Eosinophilen, daß die intraperitoneale Injektion steriler Luft frühzeitig auch zu einer starken absoluten Vermehrung dieser Zellpopulation führt. Ebenfalls hohe Eosinophilenanteile haben CHAPMAN u. REYNOLDS (1958) nach intraperitonealer Injektion von Blut in die Bauchhöhle von Mäusen erzeugen können. Da auch Brustkorbverletzungen mit nachfolgenden eosinophilen Ergüßen oft mit einem Hämatothorax vergesellschaftet sind, ist nach Auffassung einiger Autoren eine Hämorrhagie der serösen Höhlen Ursache einer Eosinophilie (BEEKMAN et al., 1974; KUMAR et al., 1975; BEESON u. BASS, 1977). Allerdings ist über die Faktoren, welche sie hervorrufen bis heute wenig bekannt (KOSS, 1979; WELLER u. GOETZL, 1980).

Zur Darstellung f i x e r Z e l l e n des Peritoneum parietale im Verband eignen sich insbesondere Imprinttechniken (CHENG u. BERRY, 1972; WHITAKER, 1980) sowie die Häutchenpräparationen (ANIWEILER, 1961; BENEKE et al., 1970; FEIGEL, 1970). Da jedoch mit der Imprinttechnik nur selten zusammenhängende Mesothelverbände gewonnen werden können, verwandten wir eine modifizierte Methode der Häutchenpräparation nach FEIGEL (1970). Diese Technik gestattet die Darstellung größerer zusammenhängender Mesothelzellverbände sowie der Zellgrenzen durch Versilberung.
Innerhalb des Mesothelverbandes ist der Formenreichtum der Zellen groß. Die besonders auffällige intensive Schlängelung der Zellgrenzen vieler Mesothelzellen entspricht dem feinstrukturellen Bild des Mesothelverbandes. Die Mesothelien sind nicht nur durch zahlreiche Desmosomen miteinander verbunden, sondern auch durch die starke Schlängelung der Zellmembranen verzahnt (LEGRAND et al., 1971). Hierdurch ist vermutlich die Stabilität gegenüber mechanischen Einwirkungen gewährleistet. So ermög-

licht es die reiche Fältelung wahrscheinlich auch, daß die Mesothelzellen in ihrem einschichtigen Verband den Verschiebungs- und Spannungskräften, denen das parietale Peritoneum ausgesetzt ist, standhalten können. Darüberhinaus könnte die Schlängelung der Zellgrenzen auch als "Membrandepot" dienen. Dies würde dann zur Geltung kommen, wenn eine Zelle aus dem Verband austritt.

An dieser Stelle erhebt sich die Frage nach dem Mesothelersatz an den Defektstellen der Serosa wie sie vereinzelt schon bei unbehandelten Tieren vorkommen, in besonderem Ausmaße aber nach intraperitonealer Applikation eines Reizstoffes entstehen. Die Diskussion über den Ablauf des Mesothelersatzes bzw. der Regeneration des Mesothels ist bisher nicht entschieden. So wird einerseits vermutet, daß sich die Mesothelien von Makrophagen ableiten, die als freie Zellen in die Bauchhöhle eintreten (BENEKE et al., 1970; MOHR et al., 1970d; 1971c,e, 1972a-c; ESKELAND, 1966; ESKELAND u. KJAERHEIM 1966; RYAN et al., 1973). Andererseits sprechen gegen diese Theorie jedoch die licht- und elektronenmikroskopischen Befunde nach experimenteller Wundsetzung (RAFTERY, 1973a,b). Danach regenerieren sich die Mesothelzellen vermutlich aus mesenchymalen Zellen der submesothelialen Bindegewebsschicht. Ungeklärt blieb dabei, welches Zellelement dieser Schicht der Ausgangspunkt der Regeneration ist. In diesem Zusammenhang ist auf unsere Beobachtung der streifen- und nestförmigen Anordnung von Mesothelzellen hinzuweisen, die abwechselnd zelldichte und zellarme Bezirke aufweisen. Diese periodenhafte Anordnung, die MOHR et al. (1970d, 1971e) bei Ratten nur im diaphragmalen Peritoneum beobachten konnte, entspricht möglicherweise sog. "Wachstumsarealen", zumal sich in diesen Bezirken vermehrt Kernteilungsfiguren registrieren lassen.

Nicht völlig geklärt ist auch die Bedeutung der Mesothelzellen mit unscharfen, fein granulierten Zellgrenzen, die wir im Gegensatz zu BENEKE et al. (1970) und MOHR et al. (1970b) auch im

Mesothelverband unbehandelter Tiere entdecken konnten. Möglicherweise spiegeln diese feingranulierten Linien besondere Formen des Zellkontaktes untereinander wieder (ZAND et al., 1982). Andererseits könnten diese breiten, verschwommenen Zellgrenzen das Vorstadium einer Zellgrenzauflösung im Rahmen physiologischer Regenerations- bzw. pathologischer Ablösungsvorgänge darstellen. Auch bei den Mesothelien mit argyrophilem Zytoplasma handelt es sich wahrscheinlich um die Vorstufen einer Zellnekrose, zumal sie gehäuft an den Defektstellen gefunden werden (BENEKE et al., 1970). Von Interesse ist ferner die Frage nach dem Grund der häufig straßenförmigen Anordnung dieser Zellen.

Die Bedeutung von "Silberdepots", die sich teilweise in den Zellgrenzen, aber auch im Zytoplasma ausfindig machen lassen, ist bislang ebenfalls nicht geklärt. Es ist möglich, daß es sich hierbei lediglich um Silbernitratgranula handelt, die innerhalb der Interzellularspalten liegen. Derartige Silberdepots werden auch in anderen Zellverbänden nach Versilberung beobachtet und finden sich dabei in Nachbarschaft von Desmosomen (ZAND et al., 1982). Sie wurden als Ausdruck einer aktiven oder passiven Aufnahme des Silbernitrats während des Färbevorganges gewertet. Bei den zum Teil mit Erythrozyten ausgefüllten porenartigen Strukturen könnte es sich um Verbindungen von kapillären Blut- oder Lymphgefäßen mit der Peritonealhöhle handeln (BIGNON et al., 1982), die es den Zellen des Blutes ermöglichen, direkt in die Bauchhöhle einzutreten. Derartige Verbindungen konnten bereits bei Schafen in der parietalen Pleura nachgewiesen werden (MARIASSY u. WHEELDON, 1983).

Die Verlaufsbeobachtungen an den fixen Zellen des Peritoneums nach Injektion der in dieser Untersuchung verwandten Virus-, Kälberserum- und Kochsalzlösung sowie nach Applikation von steriler Luft zeigen, daß es am 5. Tag p.i. zu einem Anstieg der Mitoserate kommt. Weitere morphologisch faßbaren Veränderungen des Mesothels konnten nicht beobachtet werden. Im Gegensatz da-

zu führt die intraperitoneale Applikation von Protaminsulfat bei Ratten zu ausgedehnten Mesothelschädigungen (BENEKE et al., 1970). Sehr viel ausgeprägtere reaktive Veränderungen des Mesothels im Sinne einer chronisch granulierenden Entzündung werden nach Reizung des Peritoneums mit Asbestfasern beobachtet (SHIN u. FIRMINGER, 1973).

Ziel unserer Untersuchungen ist es gewesen, die morphologischen und zellulären Reaktionen in der Peritonealhöhle zu beobachten, die nach intraperitonealer Injektion einer Coronavirus-, Eiweiß- und Kochsalzlösung sowie nach Applikation von steriler Luft auftreten. Neben einer unspezifischen granulozytären Reaktion, kommt es zu einer Vermehrung monozytärer Makrophagen. Mittels einer Differenzierung in drei kernmorphologische Typen haben wir eine Veränderung im Makrophagenzellbild im Sinne einer sog. "Linksverschiebung" beobachten können. Eine Heterogenität hinsichtlich der Herkunft dieser Zellen scheint dabei sehr wahrscheinlich zu sein.
Wichtig erscheint uns die Feststellung, daß auch die Injektion einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung eine Peritonitis erzeugen kann sowie die Applikation von Luft eine starke Eosinophilie. Dies zeigt, daß bereits eine Punktion und Flüssigkeitsgabe sowie eine nicht luftfreie Injektionstechnik die Ergebnisse nach experimentellen intrakavitären Injektionen nicht unerheblich beeinflussen können. Solche "Leerreaktionen" müssen also berücksichtigt werden.
Virusspezifische zelluläre Veränderungen (COLEMAN, 1979; GOODMAN et al., 1979) haben wir in den Peritonealzellen weder in der Pappenheim- noch in der Papanicolaoufärbung beobachten können.

5. Zusammenfassung

Freie und fixe Peritonealzellen der weißen NMRI-Maus wurden nach experimenteller peritonealer Reizung untersucht. Hierfür wurde vier Versuchsgruppen je 0.5 ml einer Coronaviruslösung vom Stamm 229 E in einer Dosis von 10^6 ID_{50}/ml oder 0.5 ml einer 2%igen fetalen Kälberserumlösung oder 0.5 ml einer physiologischen Kochsalzlösung bzw. 1.0 ml steril gefilterte Luft intraperitoneal injiziert. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Nach 6, 12, 18 und 24 Stunden p.i. und anschließend täglich bis längstens zum 10. Tag wurden die freien Peritonealzellen mittels Peritoneallavage gewonnen. Diese lassen sich in 7 verschiedene Zellarten unterteilen: neutrophile und eosinophile Granulozyten, basophile Peritonealzellen, Lymphozyten sowie monozytäre Makrophagen, die kernmorphologisch in drei Typen unterteilt werden können.
Die Injektion der Testsubstanzen verursachte nach 6 Stunden ein prozentuales Maximum neutrophiler Granulozyten mit raschem Abfall in den folgenden 2 bis 3 Tagen. Gleichzeitig kam es zu einer deutlichen prozentualen Umverteilung der drei Makrophagentypen, die als sog. "Linksverschiebung" innerhalb dieser Differenzierungsstufen gedeutet werden könnte. Die Rückbildung dieser reaktiven Veränderung verlief in den einzelnen Versuchsgruppen unterschiedlich. Ferner fanden sich morphologische Anhaltspunkte, daß es sich bei einem Teil der freien Peritonealmakrophagen um losgelöste Mesothelien handeln könnte.
Nach intraperitonealer Luftapplikation wurde ein signifikanter Anstieg eosinophiler Granulozyten bis zu 31.0 $\pm$6.0 % am 3. Tag p.i. verzeichnet.
Vom Peritoneum parietale wurden ab dem 3. Tag p.i. von einigen Tieren Häutchenpräparate erstellt. Die Präparation des zusammenhängenden, einschichtigen Mesothelverbandes erlaubte

nach Darstellung der Zellgrenzen durch Versilberung die Beobachtung morphologischer Strukturen. Insbesondere fielen die wechselnd ausgeprägte Schlängelung der Zellgrenzen sowie die periodenhafte straßen- und nestförmige Anordnung von kleinen Mesothelzellen auf. Die starke Fältelung der Grenzlinien dient vermutlich statischen Funktionen, während die periodenhafte Anordnung kleiner Mesothelien wahrscheinlich Wachstumsarealen entspricht.

In den Häutchenpräparaten der behandelten Tiere konnte ein Anstieg der Mitosen am 5. Tag p.i. registriert werden. Weitere morphologische Auffälligkeiten gegenüber den Kontrolltieren wurden nicht beobachtet.

6. Literaturverzeichnis

Abe K, Honma S, Ito T (1979)
Peritoneal cells in mice: quantitative and qualitative cell morphology.
Am J Anat 156: 37-50

Antweiler H (1961)
Eine einfache Methode zur Darstellung von tierischen Häutchenpräparaten für physiologisch-pharmakologische Untersuchungen und zur Mikroskopie (Mastzelldarstellung).
Arzneim Forsch 11: 323-325

Aronson M, Shahar A (1965)
Formation of histiocyts by the omentum in vitro.
Exp Cell Res 38: 133

Beekman JF, Bosniak S, Canter HG (1974)
Eosinophilia and elevated IgE concentration in a serous pleural effusion following trauma.
Am Rev Resp Dis 110: 484-489

Beeson PB, Bass DA (1977)
The eosinophil.
In: Smith jr LH (ed.)
Mayor problems in internal medicine
Vol 14
WB Saunders Company, Philadelphia-London-Toronto

Beneke G, Feigel HW, Mohr W (1970)
Die Reaktion des parietalen Peritoneums der Ratte in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Gerontologia 16: 283-303

Bennett B (1965)
A method for performing differential counts on peritoneal cells populations from mice.
Transplantation 3: 254-257

Bignon J, Bernaudin JF, Jaurand MC, Pinchon MC (1982)
The pleura: mesothelial cells and mesothelioma.
In: Cumming G, Bonsignore G (eds.)
Cellular bilogy of the lung.
Vol 10
Plenum press, New York and London, S.149-173

Boak JL, Christie GH, Ford WL (1968)
Pathways in the development of liver macrophages: Alternative precursors contained in populations of lymphocytes and bone-marrow cells.
Proc Roy Soc B 169: 307-327

Carr I (1967)
The fine structure of the cells of the mouse peritoneum.
Z Zellforsch 80: 534-555

Carr I, Clarke JA, Salsbury AJ (1969)
The surface structure of mouse peritoneal cells - a study with the scanning electron microscope.
J Microsc 89: 105-111

Chapman JS, Reynolds RC (1958)
Eosinophilic response to intraperitoneal blood.
J Lab Clin Med 51: 516-520

Cheng H, Berry M (1972)
A technique for the preparation of monolayers of mesothelium.
J Histochem Cytochem 20: 542-544

Coleman DV (1979)
Cytological diagnosis of virus-infected cells in Papanicolaou smears and its application in clinical practice.
J Clin Pathol 32: 1075-1089

Courtice FL, Harding J, Steinbeck A (1953)
The removal of free red blood cells from the peritoneal cavity of animals.
Austr J Exp Biol 31: 215-225

Daems WT, Koerten HK (1978)
The effects of various stimuli on the cellular composition of peritoneal exudates in the mouse.
Cell Tiss Res 190: 47-60

Domagala W, Koss LG (1979)
Surface configuration of mesothelial cells in effusions.
Virchows Arch B Cell Path 30: 231-243

Efrati P, Nir E (1976)
Morphological and cytochemical investigation of human mesothelial cells from pleural and peritoneal effusions.
Israel J Med Sci 12: 662-673

Eskeland G (1966)
Regeneration of parietal peritoneum.
1. A light microscopical study.
Acta Pathol Microbiol Scand 68: 355-378

Eskeland G, Kjaerheim A (1966)
Regeneration of parietal peritoneum.
2. An electron microscopical study.
Acta Pathol Microbiol Scand 68: 379-395

Feigel HW (1970)
Untersuchungen zur Regeneration von Peritonealdeckzellen in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Med Diss, Giessen

Forbes IJ (1965)
Induction of mitosis in macrophages by endotoxin.
J Immunol 94: 37-39

Forbes IJ (1966)
Mitosis in mouse peritoneal macrophages.
J Immunol 96: 734-743

Furth van R, Hirsch JG, Fedorko ME (1970)
Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocytes, monocytes and macrophges.
J Exp Med 132: 794-812

Fruhman GJ (1959)
Mobilization of neutrophils into peritoneal fluid following intraperitoneal injection of bacterial endotoxin.
Proc Soc Exp Biol Med 102: 423-425

Goodman ZD, Gupta PK, Frost JK, Erozan YS (1979)
Cytodiagnosis of viral infections in body cavity fluids.
Acta Cytol 23: 204-208

Honma S, Abe K, Ito T (1980)
Age- and sex-related changes of peritoneal free cells in mice: quantitative morphologic study.
Arch Hist Jap 43: 127-139

Joos F, Roos B, Bürki H, Laissue J (1969)
Umsatz, Proliferation und Phagozytosetätigkeit der freien Zellen Im Peritonäalraum der Maus nach Injektion von Polystyren-Partikeln.
Z Zellforsch 95: 68-85

Koss LG (1979)
Effusion in the absence of cancer.
In: Diagnostic cytology and its histopathologic bases.
Vol 1, 3rd ed.
JB Lippincott Company, Philadelphia-Toronto

Kumar, UN, Varkey B, Mathai G (1975)
Posttraumatic pleural fluid and blood eosinophilia.
JAMA 234: 625-626

Leder LD, Stutte HJ (1975)
Seminar für hämatologisch-zytochemische Techniken.
Verh Dtsch Ges Pathol 59: 503-509

Lee S, Schoen I (1967)
Eosinophilia of peritoneal fluid and peripheral blood associated with chronic peritoneal dialysis.
Am J Clin Pathol 47: 638-639

Legrand M, Pariente R, André J, Chrétien J, Brouet G (1971)
Ultrastructure de la Plèvre pariétale humaine.
Presse Med. 55: 2515-2520

Lokay J, Feit J (1968)
Der Einfluß der Immunisierung auf die Synthese von DNS in den peritonealen Zellen der Maus.
Z Immunitätsforsch Immunbiol 134: 120-128

Marchand, F (1899)
Ueber die bei Entzündungen in der Peritonealhöhle auftretenden Zellformen.
Verh Dtsch Ges Pathol 1: 63-81

Mariassy AT, Wheeldon EB (1983)
The pleura: a combinied light microscopic, scanning and transmission electron microscopic study in the sheep.
I. Normal pleura.
Exp Lung Res 4: 293-313

Marsan C, Cayphas J (1974)
The aid of some histochemical stains in the identification of mesothelial cells. Preliminary results.
Acta Cytol 18: 252-258

Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B, Wittmann G (1974)
Virologische Arbeitsmethoen.
Band I.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Mims CA (1964)
The peritoneal macrophages of mice.
Brit J Exp Path 45: 37-43

Mohr W (1970)
Reaktion der freien Peritonealmakrophagen und der Mesothelzellen nach intraperitonealer Injektion bei der Ratte.
Verh Dtsch Ges Pathol 54: 421-425

Mohr W, Beneke G, Dunkel HJ, Murr L (1970a)
Untersuchungen zum Ablauf der Phagozytose in der Peritonealflüssigkeit der Ratte.
Path Microbiol 35: 377-392

Mohr W, Beneke G, Murr L (1970b)
Die Transformation von Mesothelzellen in Hyaluronsäure produzierende Siegelringzellen.
Experientia 26: 1347-1348

Mohr W, Beneke G, Murr L (1970c)
Untersuchungen über die Phagozytoseaktivität von Peritonealflüssigkeitszellen während der Neonatalperiode der Ratte.
Path Microbiol 36: 153-160

Mohr W, Beneke G, Murr L (1970d)
Transformation von Zellen der Peritoneal- und Pleurahöhle durch Phytohämagglutinin.
Beitr Path 142: 90-113

Mohr W, Beneke G, Carl H (1971a)
Proliferation von Peritonealflüssigkeitszellen in implantierten Diffusionskammern.
Beitr Path 144: 63-79

Mohr W, Beneke G, Murr (1971b)
Proliferation von Peritonealmakrophagen der Ratte.
Virchows Arch (Cell Pathol) 8: 16-19

Mohr W, Beneke G, Murr L (1971c)
Proliferation der Zellsysteme im Cavum peritonei:
I. Proliferation von Mesothelzellen, submesothelialen Bindegewebszellen, Endothelzellen und freien Zellen der Peritonealflüssigkeit induziert durch Phytohämagglutinin.
Beitr Path 143: 345-359

Mohr W, Beneke G, Murr L (1971d)
Untersuchungen zur Mitreaktion der Pleura bei peritonealen Reizungen.
Path Microbiol 37: 459-468

Mohr W, Beneke G, Murr L (1971e)
Mesothelzellveränderungen nach intraperitonealer Injektion von denaturiertem Phytohämagglutinin.
Experientia 27: 301-303

Mohr W, Beneke G, Murr L (1972a)
Proliferation der Zellsysteme im Cavum peritonei:
II. Proliferation von Mesothelzellen, submesothelialen Bindegewebszellen, Endothelzellen und freien Zellen der Peritonealflüssigkeit induziert durch Endotoxin.
Beitr Path 145: 381-394

Mohr W, Beneke G, Murr L (1972b)
Proliferation der Zellsysteme im Cavum peritonei:
III. Proliferation von Mesothelzellen, submesothelialen Bindegewebszellen, Endothelzellen und freien Zellen der Peritonealflüssigkeit induziert durch Rinderserumalbumin.
Beitr Path 146: 1-11

Mohr W, Beneke G, Murr L (1972c)
Proliferation der Zellsysteme im Cavum peritonei:
IV. Proliferation von Mesothelzellen, submesothelialen Bindegewebszellen, Endothelzellen und freien Zellen der Peritonealflüssigkeit nach Punktion der Bauchhöhle.
Beitr Path 146: 12-19

Murch AR, Papadimitriou JM (1981)
The kinetics of murine peritoneal macrophage replication.
J Pathol 133: 177-183

Ogawa T, Koerten HK, Daems WT (1978)
Peroxidatic activity in monocytes and tissue macrophages of mice.
Cell Tiss Res 188: 361-373

Parwaresch MR, Müller-Hermelink HK, Desaga JF, Zakari V, Lennert K (1971)
Die Herkunft der Gewebsmastzellen bei der Ratte, zugleich ein Beitrag zur quantitativen Cytologie der sterilen Peritonitis.
Virchows Arch B (Cell Pathol) 8: 20-35

Pfitzer P (1970)
The DNA content of alveolar macrophages and so-called alveolar cell carcinoma.
Acta Cytol 14: 479-485

Pfitzer P (1973)
Exfoliativ-Zytologie der Pleura und des Peritoneums.
Verh Dtsch Ges Pathol 57: 96-106

Pfitzer P (1980)
Amitosis: a historical misinterpretation?
Path Res Pract 167: 292-300

Raftery AT (1973a)
Regeneration of parietal and visceral peritoneum.
A light microscopical study.
Brit J Surg 60: 293-299

Raftery AT (1973b)
Regeneration of parietal and visceral peritoneum.
An electron microscopical study.
J Anat 115: 375-392

Ryan GB, Grobéty J, Manjo G (1973)
Mesothelial injury and recovery.
Am J Pathol 71: 93-112

Saini JS, Lal M, Rai J (1980)
Eosinophilic pleural effusion following pneumothorax.
Indian J Chest Dis Allied Sci 22:133-136

Schäfer HE, Fischer R (1968)
Der Peroxidasenachweis an Ausstrichspräparaten sowie an Gewebsschnitten nach Entkalkung und Paraffineinbettung.
Klin Wschr 46: 1228-1230

Schwartz E (1914)
Lehre von allgemeiner und örtlicher Eosinophilie.
Ergebn Allg Path 17: 137

Shin ML, Firminger HI (1973)
Acute and chronic effects of intraperitoneal injections of two types of asbestos in rats with a study of the histopathogenesis and ultrastructure of resulting mesotheliomas.
Am J Pathol 70: 291-314

Steer HW, Lewis DA (1983)
Peritoneal cell responses to acute gastrointestinal inflammation.
J Pathol 140: 237-253

Sulavik S, Katz S (1963)
Pleural effusion.
Charles C Thomas, Springfield, Illinois, S. 36-47

Undritz E (1972)
Hämatologische Tafeln.
2. Auflage
Sandoz AG, Basel

Veress JF, Koss LG, Schreiber K (1979)
Eosinophilic pleural effusion.
Acta Cytol 23: 40-44

Weller PF, Goetzl EJ (1980)
The human eosinophil: roles in host defense and tissue injury.
Am J Pathol 100: 793-820

Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters M (1980)
The mesothelium: techniques for investigating the origin, nature and behavior of mesothelial cells.
J Pathol 132: 263-271

Zand T, Underwood JM, Manjo G, Joris I (1982)
Endothelium and "silver lines".
Virchows Arch A (Pathol Anat) 395: 133-144

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. P. Pfitzer für die freundliche Überlassung des Themas und stetige Unterstützung bei der Erarbeitung.

Die Coronaviruslösung wurde uns dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. K. Schmidt und Frau Klein vom Virologischen Institut der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.
An dieser Stelle sei auch allen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts für ihre Unterstützung gedankt, insbesondere auch Herrn Dr. K.-F. Bürrig für seine Beratungen bei der Erstellung dieser Arbeit.

Peter G. Cremerius

Lebenslauf

Name:	Peter Georg Cremerius
Geboren:	am 27. Juni 1953 in Grevenbroich (NRW)
Eltern:	Michael Cremerius, Studiendirektor a.D., Gertrud Cremerius, geb. Hammers.
Verheiratet:	seit November 1977 mit der Kinderkrankenschwester Marianne Cremerius, geb. Witte. Geburt der Tochter Sabrina im April 1983.
Schule:	Einschulung 1959 in die Volksschule Grevenbroich. 1964 - 1972 Besuch des Kreisgymnasiums in Grevenbroich.
1972 - 1974:	Dienst als Polizeivollzugsbeamter a.W. im Bundesgrenzschutz in Bonn.
1974 - 1975:	Aushilfstätigkeit in der wiss. Literatur-Dokumentation der pharmazeutischen Firma Nattermann in Köln.
Ab März 1975:	Pflegepraktikum und Aushilfstätigkeit als Pflegekraft im Krankenhaus Grevenbroich.
WS 1975/1976	Ein Semester Studium der Chemie an der RWTH Aachen.
Ab April 1976:	Aushilfstätigkeit im Pflegedienst im Krankenhaus Grevenbroich.
Okt.76 - Sep. 77:	Krankenpflegeschüler in der Krankenpflegeschule des Krankenhauses Grevenbroich.
Okt.77 - Okt. 83:	Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf. "Praktisches Jahr" im Krankenhaus Düsseldorf-Gerresheim.
Seit 2.1.84	Assistenzarzt auf der Inneren Abteilung des Krankenhauses Düsseldorf-Gerresheim.